

**VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M/39113-PCT	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des Internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/ 03889	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 04/06/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 05/06/1998
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfasst insgesamt 5 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der Sprache ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE-GENE

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

wie vom Anmelder vorgeschlagen

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

T 15

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

REC'D 18 OCT 2000
WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M/39113-PCT	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/03889	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 04/06/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 05/06/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N9/10		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 10 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor der Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 34 Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input checked="" type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input checked="" type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung 		

Datum der Einreichung des Antrags 22/12/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 13.10.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Barnas, C Tel. Nr. +49 89 2399 7469 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/03889

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-48 ursprüngliche Fassung

49-76 eingegangen am 16/11/1999 mit Schreiben vom 16/11/1999

Patentansprüche, Nr.:

1-32 eingegangen am 25/09/2000 mit Schreiben vom 22/09/2000

Zeichnungen, Blätter:

1-7 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

Beschreibung, Seiten:
 Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

3. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erforderlicher Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

die gesamte internationale Anmeldung.
 Ansprüche Nr. 5, 31, 32 (teilweise).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/03889

Begründung:

- Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 5, 31, 32 (teilweise) sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
- Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 5, 31, 32 (teilweise) sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- Für die obengenannten Ansprüche Nr. 27 wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
 - die Ansprüche eingeschränkt.
 - zusätzliche Gebühren entrichtet.
 - zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
 - weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
 - erfüllt ist
 - aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
 - alle Teile.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/03889

die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. 1, 2, 4-32 beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1, 2, 4, 5, 7-23, 25-28, 31, 32
	Nein: Ansprüche 6, 24, 29, 30
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 2, 4, 7, 27, 31, 32
	Nein: Ansprüche 1, 5, 8-23, 25, 26, 28
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1, 2, 4-32
	Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: LEPINIEC L ET AL., : 'Characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA homologue to animal poly(ADP-ribose) polymerase' FEBS LETTERS, Bd. 364, 1995, Seiten 103-108, XP000867423 in der Anmeldung erwähnt

D2: GRIFFIN R J ET AL: 'NOVEL POTENT INHIBITORS OF THE DNA REPAIR ENZYME POLY(ADP-RIBOSE)POLYMERASE (PARP)' ANTI-CANCER DRUG DESIGN, GB, BÄSINGSTOKE, Bd. 10, Nr. 6; 1995, Seite 507-514 XP002065156 ISSN: 0266-9536 in der Anmeldung erwähnt EUCARYOTIC CELL LINES' 1992, POIRIER, G.G. AND MOREAU P., EDS, SPRINGER, NEW YORK XP000568905

D3: KUEPPER J-H AND BUERKLE A.: 'EXPRESSION OF THE DNA-BINDING DOMAIN OF HUMAN POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE AS A TRANS-DOMINANT INHIBITOR OF POLY(ADP-RIBOSYL)ATION IN TRANSFECTED

Zu Punkt I

Grundlage des Bescheides

Der Bescheid basiert auch auf den Blättern 49-76 (i.e. Sequenzprotokoll), der Beschreibung, eingereicht mit dem Brief vom 16.11.1999, erhalten am 16.11.1999.

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Bindungspartner mit Spezifität für PARP-Homologe nach Anspruch 5 (b) als solche wurden in der vorliegenden Anmeldung nicht offenbart und sind nicht aus dem Stand der Technik bekannt. Der Gegenstand besagten Anspruchs kann daher keiner sinnvollen Prüfung unterzogen werden.
2. Weiters werden auch, mit Ausnahme von 4-(N-(4-Hydroxyphenyl)aminomethyl)-(2H)-dihydrophthalazin-1-on, keine niedermolekulare Effektoren gemäß Anspruch 5 (c) als solche offenbart. Besagter Anspruch sowie die sich darauf beziehenden Verwendungsansprüche 31 und 32 können daher nur geprüft werden sofern sie sich auf besagte Substanz beziehen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

Die folgenden Gruppen von Erfindungen sind nicht durch eine einzige allgemeine erfinderische Idee verbunden:

Gruppe 1: Anspruch 1 (ganz); Ansprüche 5, 6, 8-32 (teilweise)

Ein PARP-Homologes, wie in Anspruch 1 beschrieben, welches eine funktionale NAD+-Bindungsdomäne und kein Zink-Finger-Sequenzmotiv aufweist.

Gruppe 2: Ansprüche 2, 4 (auf Anspruch 2 oder 3 rückbezogen), 7 (ganz),
Ansprüche 3 (auf Anspruch 2 rückbezogen), 5, 6, 8-32 (teilweise)

Ein PARP-Homologes nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die funktionale NAD+-Bindungsdomäne eines der in Anspruch 2 beschriebenen Sequenzmotive umfaßt,

ein PARP-Homologes nach Anspruch 2, umfassend wenigstens ein weiteres der in Anspruch 3 beschriebenen Teilsequenzmotive und

ein PARP-Homologes nach Anspruch 2 oder 3 ausgewählt unter humanen PARP-Homologen gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 (humanPARP2) oder SEQ ID NO: 4 oder 6 (humanPARP3 Typ 1 bzw. 2); oder murinen PARP-Homologen gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:8 (mausPARP Langform) oder SEQ ID NO: 10 (mausPARP Kurzform); und Nukleinsäuren wie in Anspruch 7 beschrieben, die für besagte humane und murine PARP-Homologe kodieren.

Gruppe 3: Ansprüche 3 (auf Anspruch 1 rückbezogen), 5, 6, 8-32 (alle teilweise)

Ein PARP-Homologes nach Anspruch 1 welches zusätzlich wenigstens das Teilsequenz-Motiv $LX_9NX_2YX_2QLLX(D/E)X_{10/11}WGRVG$ umfaßt.

Gruppe 4: Ansprüche 3 (auf Anspruch 1 rückbezogen), 5, 6, 8-32 (alle teilweise)

Ein PARP-Homologes nach Anspruch 1 welches zusätzlich wenigstens das Teilsequenz-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Motiv $AX_3FXKX_4KTXNXWX_5FX_3PXK$ umfaßt.

Gruppe 5: Ansprüche 3 (auf Anspruch 1 rückbezogen), 5, 6, 8-32 (alle teilweise)

Ein PARP-Homologes nach Anspruch 1 welches zusätzlich wenigstens das Teilequenz-
Motiv $QXL(I/L)X_2IX_9MX_{10}PLGKLX_3QIX_6L$ umfaßt.

Gruppe 6: Ansprüche 3 (auf Anspruch 1 rückbezogen), 5, 6, 8-32 (alle teilweise)

Ein PARP-Homologes nach Anspruch 1 welches zusätzlich wenigstens das Teilequenz-
Motiv $FYTXIPHXFGX_3PP$ umfaßt.

Gruppe 7: Ansprüche 3 (auf Anspruch 1 rückbezogen), 5, 6, 8-32 (alle teilweise)

Ein PARP-Homologes nach Anspruch 1 welches zusätzlich wenigstens das Teilequenz-
Motiv $KX_3LX2LXDIEKAK_2L$ umfaßt.

Jede der angeführten Gruppe von Erfindungen beinhaltet weiters Bindungspartner für die PARP-Homologen wie in Anspruch 5 beschrieben; Verwendung niedermolekularer PARP- Bindungspartner nach Anspruch 5 wie in den Ansprüchen 31 und 32 beschrieben; Nukleinsäuren wie in Anspruch 6 beschrieben, die für die PARP-Homologen kodieren, Nukleinsäuren, die zu besagten kodierenden Nukleinsäuren hybridisieren und Nukleinsäuren die von besagten Nukleinsäuren abgeleitet sind; Expressionskassetten, rekombinante Vektoren, rekombinante Mikroorganismen und transgene Säuger wie in den Ansprüchen 8-11 beschrieben, die Nukleinsäuren gemäß Anspruch 6 enthalten; PARP- defizienter Säuger oder PARP-defiziente eukaryontische Zellen wie in Anspruch 12 beschrieben, worin eine funktionelle Expression wenigstens eines Gens inhibiert ist, das für ein PARP Homologes nach einem der Ansprüche 1-4 kodiert; in vitro Nachweisverfahren für PARP-Inhibitoren wie in den Ansprüchen 13-22 beschrieben; in vitro-Screeningverfahren auf Bindungspartner für ein PARP-Molekül, wie in Anspruch 23 beschrieben; Verfahren zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung von PARP- Homologen und PARP-Homologen kodierenden Nukleinsäuren, wie in Ansprüchen 24-27 beschrieben; Verfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit von PARP-Effektoren, wie in Anspruch 28 beschrieben; ein gentherapeutisches Mittel wie in Anspruch 29 beschrieben und ein pharmazeutisches Mittel wie in Anspruch 30 beschrieben.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Der technische Zusammenhang, der zwischen den oben angeführten Gruppen von Erfindungen besteht, kommt in dem in Anspruch 1 beschriebenen PARP-Homologen zum Ausdruck. Ein PARP-Homologes wie in Anspruch 1 ist jedoch bereits aus dem Stand der Technik bekannt (siehe in diesem Zusammenhang auch **Zu Punkt V**, Neuheit, Absatz 1.1.):

D1 offenbart die poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) von *Arabidopsis thaliana* (S 104, Fig. 1A; S 105, Absatz 3.2. und Fig. 2). Besagtes PARP weist eine funktionelle NAD⁺-Bindungsdomäne auf und besitzt kein Zink-Finger-Sequenzmotiv. Das in Anspruch 1 beschriebene PARP-Homologe ist daher nicht neu gegenüber dem in D1 offenbarten *Arabidopsis* PARP-Homologen.

Zwischen den oben angeführten Gruppen von Erfindungen besteht daher kein technischer Zusammenhang, der in einem oder mehreren gleichen oder entsprechenden besonderen technischen Merkmal/en zum Ausdruck kommt und besagte Gruppen von Erfindungen sind somit nicht durch eine einzige allgemeine erfinderische Idee verbunden (Mangelnde Einheitlichkeit, *a posteriori*).

Nach Entrichtung einer weiteren einmaligen Prüfungsgebühr wird, gemäß des Antrags des Anmelders im Brief vom 7.7.2000, die Prüfung auf die unter Gruppe 1 und 2 gelisteten Ansprüche (i.e. Ansprüche 1, 2 und 4-32) beschränkt.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Art. 33(2) PCT, Neuheit

1.1. D1 offenbart eine Nukleinsäure welche für das PARP-Homologe aus *Arabidopsis thaliana* codiert cDNA sowie Southern Blot und Northern Blot Hybridisierungen zur Bestimmung derselben (siehe Fig. 3 und 4). Besagtes *Arabidopsis thaliana* PARP-Homologe weist die in Anspruch 1 angegebenen strukturellen Merkmale auf. Die Angabe über die Herkunft eines Proteins, wie in geändertem Anspruch 1 eingefügt, i.e. "aus einem menschlichen oder nicht-menschlichen Säuger", stellt nicht ein Merkmal dar welches die

THIS PAGE BLANK (USPTO)

chemische Struktur eines Proteins als solches charakterisiert. Besagter Wortlaut in geändertem Anspruch 1 dient daher nicht zur Unterscheidung gegenüber dem PARP-Homogen aus D1. D1 ist daher neuheitsschädlich für **Ansprüche 6, 24 und 30**.

1.2. D3 offenbart einen Vektor, der für die DNA-bindende Domäne des humanen PARP codiert (S 40, Fig. 1). Diese Domäne stellt einen spezifischen PARP Inhibitor dar. D3 ist daher neuheitsschädlich für **Anspruch 29**.

2. Art. 33(3) PCT, Erfinderische Tätigkeit

2.1. Das in Anspruch 1 mitumfaßte *Arabidopsis thaliana* PARP-Homologe welches von der bekannten Nukleinsäure aus D1 codiert wird sowie dafür spezifische Antikörper stellen das Ergebnis von Routineverfahren dar, die der Fachmann, den Umständen entsprechend, ohne erfinderisches Zutun, durchführen würde. Dies gilt auch für die Gegenstände von Ansprüchen 8-12, 25 und 26 sofern sich besagte Ansprüche auf das *Arabidopsis thaliana* PARP-Homologe beziehen. **Ansprüche 1, 5, 8-12, 25 und 26** sind daher nicht erfinderisch.

2.2. D2 (S 509) offenbart ein Nachweisverfahren für PARP-Inhibitoren von humanem PARP. Da Histone die natürlichen Targets für PARP Proteine darstellen, wird davon ausgegangen, daß in diesem Verfahren das Poly-ADP- ribosylierbare Target ein Histon-Protein ist. Besagtes Nachweisverfahren beinhaltet daher die in **Ansprüchen 13, 15-17 und 28** angegebenen Verfahrensschritte. Die Anwendung dieses Verfahrens zum Nachweis von Inhibitoren für das PARP Homologe von *Arabidopsis thaliana* wäre für den Fachmann ein naheliegender Schritt, den er den Umständen entsprechend, auch durchführen würde. Die in **Anspruch 14** beschriebene Variation der in D2 angegebenen Verfahrensschritte stellt eine in diesem Feld übliche Variierung von enzymatischen Nachweisreaktionen dar. Der Nachweis der Poly-ADP-Ribosylierungsaktion durch Anti-Poly-(ADP-ribose)- Antikörpern ist aus D3 (Fig. 3) bekannt. Die Durchführung des Nachweisverfahrens für PARP Inhibitoren mit Hilfe solcher Antikörper würde daher für den Fachmann eine naheliegende Variation des Verfahrens von D2 darstellen. Die in **Ansprüchen 18-22** beschriebenen Merkmale stellen Routineverfahren dar um eine Antigen-Antikörper Bindung sichtbar zu machen. **Ansprüche 13-22 und 28** sind daher nicht erfinderisch.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2.3. Ein in vitro-Screeningverfahren auf Bindungspartner für ein Protein welches von einer bekannten Nukleinsäure kodiert wird, wie in Anspruch 23 beschrieben, stellt ein Routineverfahren dar, daß der Fachmann, den Umständen entsprechend ohne erforderisches Zutun anwenden würde. **Anspruch 23** ist daher nicht erforderlich.

3. Zusätzliche Bemerkungen

PARP-Homologe nach **Anspruch 2** sowie humane und murine PARP-Homologe und deren codierende Nukleinsäuresequenzen wie in **Ansprüchen 4 und 7** angegeben sind aus dem Stand der Technik weder bekannt noch daraus in naheliegender Weise ableitbar. Besagte Ansprüche sind daher neu und scheinen erforderlich. Dies gilt auch für ein Verfahren zur Diagnositzierung gemäß **Anspruch 27**, den PARP2 spezifischen Inhibitor 4-(N-(4-Hydroxyphenyl)aminomethyl)-(2H)-dihydrophthalazin-1-on (Anspruch 5c) sowie die Verwendung besagter Substanz gemäß **Ansprüchen 31 und 32**.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Klarheit, Art. 6 PCT

1. Die Begriffe "Energiedefizienz-vermittelte Erkrankungen" (Anspruch 27) sowie "Krankheitszustände, die durch eine Energiedefizienz vermittelt sind" (Anspruch 32) haben in diesem Feld keine allgemein anerkannte Bedeutung und stellen daher keine technische Merkmale dar, durch die der beanspruchte Gegenstand klar festgelegt werden kann (Regel 6.3 (a) PCT). Der Gegenstand besagter Ansprüche ist daher nicht klar definiert (Art. 6 PCT). Generell soll der Gegenstand des Schutzbegehrens in den Ansprüchen durch technischen Merkmale angegeben werden (Regel 6.2 (a) PCT).

2. In Anspruch 27 ist nicht angegeben wie das Ergebnis einer beschriebenen Bestimmung zur erfolgreichen Diagnostizierung verwendet werden kann. Da diese Angaben, welche als wesentlich betrachtet werden, in Anspruch 27 (Regel 6.2 (a) PCT), fehlen ist besagter Anspruch nicht klar.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft
 <120> Neue Poly(ADP-ribose)polymerase-Gene
 <130> M/39113-PCT
 <140> PCT/EP 99/03889
 <141> 1999-06-04
 <160> 28
 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 1843
 <212> DNA
 <213> Brain
)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (3)..(1715)
 <223> Product= Poly ADP Ribose Polymerase

<400> 1
 cc atg gcg gcg cgg cgg cga cgg agc acc ggc ggc agg gcg aga 47
 Met Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Arg Ala Arg
 1 5 10 15
 gca tta aat gaa agc aaa aga gtt aat aat ggc aac acg got cca gaa 95
 Ala Leu Asn Glu Ser Lys Arg Val Asn Asn Gly Asn Thr Ala Pro Glu
 20 25 30
 gac tct tcc cct gcc aag aaa act cgt aga tgc cag aga cag gag tcg 143
 Asp Ser Ser Pro Ala Lys Lys Thr Arg Arg Cys Gln Arg Gln Glu Ser
 35 40 45
 aaa aag atg cct gtg gct gga gga aaa gct aat aag gac agg aca gaa 191
 Lys Lys Met Pro Val Ala Gly Gly Lys Ala Asn Lys Asp Arg Thr Glu
 50 55 60
 gac aag caa gat gaa tct gtg aag gcc ttg ctg tta aag ggc aaa gct 239
 Asp Lys Gln Asp Glu Ser Val Lys Ala Leu Leu Lys Gly Lys Ala
 65 70 75
 cct gtg gac cca gag tgt aca gcc aag gtg ggg aag gct cat gtg tat 287
 Pro Val Asp Pro Glu Cys Thr Ala Lys Val Gly Lys Ala His Val Tyr
 80 85 90 95
 tgt gaa gga aat gat gtc tat gat gtc atg cta aat cag acc aat ctc 335
 Cys Glu Gly Asn Asp Val Tyr Asp Val Met Leu Asn Gln Thr Asn Leu
 100 105 110
 cag ttc aac aac aac aag tac tat ctg att cag cta tta gaa gat gat 383
 Gln Phe Asn Asn Asn Lys Tyr Tyr Leu Ile Gln Leu Leu Glu Asp Asp
 115 120 125
 gcc cag agg aac ttc agt gtt tgg atg aga tgg ggc cga gtt ggg aaa 431
 Ala Gln Arg Asn Phe Ser Val Trp Met Arg Trp Gly Arg Val Gly Lys
 130 135 140

THIS PAGE BLANK (USPTO)

atg gga cag cac agc ctg gtc gct tgc tca ggc aat ctc aac aag gcc	479
Met Gly Gln His Ser Leu Val Ala Cys Ser Gly Asn Leu Asn Lys Ala	
145 150 155	
aag gaa atc ttt cag aag aaa ttc ctt gac aaa acg aaa aac aat tgg	527
Lys Glu Ile Phe Gln Lys Lys Phe Leu Asp Lys Thr Lys Asn Asn Trp	
160 165 170 175	
gaa gat cga gaa aag ttt gag aag gtc cct gga aaa tat gat atg cta	575
Glu Asp Arg Glu Lys Phe Glu Lys Val Pro Gly Lys Tyr Asp Met Leu	
180 185 190	
cag atg gac tat gcc acc aat act cag gat gaa gag gaa aca aag aaa	623
Gln Met Asp Tyr Ala Thr Asn Thr Gln Asp Glu Glu Thr Lys Lys	
195 200 205	
gag gaa tct ctt aaa tct ccc ttg aag cca gag tca cag cta gat ctt	671
Glu Glu Ser Leu Lys Ser Pro Leu Lys Pro Glu Ser Gln Leu Asp Leu	
210 215 220	
cgg gta cag gag tta ata aag ttg atc tgc aat gtt cag gcc atg gaa	719
Arg Val Gln Glu Leu Ile Lys Leu Ile Cys Asn Val Gln Ala Met Glu	
225 230 235	
gaa atg atg atg gaa atg aag tat aat acc aag aaa gcc cca ctt ggg	767
Glu Met Met Glu Met Lys Tyr Asn Thr Lys Lys Ala Pro Leu Gly	
240 245 250 255	
aag ctg aca gtc gca caa atc aag gca ggt tac cag tct ctt aag aag	815
Lys Leu Thr Val Ala Gln Ile Lys Ala Gly Tyr Gln Ser Leu Lys Lys	
260 265 270	
att gag gat tgc att cgg gtc ggc cag cat gga cga gct ctc atg gaa	863
Ile Glu Asp Cys Ile Arg Ala Gly Gln His Gly Arg Ala Leu Met Glu	
275 280 285	
gca tgc aat gaa ttc tac acc agg att ccg cat gac ttt gga ctc cgt	911
Ala Cys Asn Glu Phe Tyr Thr Arg Ile Pro His Asp Phe Gly Leu Arg	
290 295 300	
act cct cca cta atc cgg aca cag aag gaa ctg tca gaa aaa ata caa	959
Thr Pro Pro Leu Ile Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys Ile Gln	
305 310 315	
tta cta gag gtc ttg gga gac att gaa att gct att aag ctg gtc aaa	1007
Leu Leu Glu Ala Leu Gly Asp Ile Glu Ile Ala Ile Lys Leu Val Lys	
320 325 330 335	
aca gag cta caa agc cca gaa cac cca ttg gac caa cac tat aga aac	1055
Thr Glu Leu Gln Ser Pro Glu His Pro Leu Asp Gln His Tyr Arg Asn	
340 345 350	
cta cat tgc ttg cgc ccc ctt gac cat gaa agt tac gag ttc aaa	1103
Leu His Cys Ala Leu Arg Pro Leu Asp His Glu Ser Tyr Glu Phe Lys	
355 360 365	
gtg att tcc cag tac cta caa tct acc cat gct ccc aca cac agc gac	1151
Val Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Ser Thr His Ala Pro Thr His Ser Asp	
370 375 380	
tat acc atg acc ttg ctg gat ttg ttt gaa gtc gag aag gat ggt gag	1199
Tyr Thr Met Thr Leu Leu Asp Leu Phe Glu Val Glu Lys Asp Gly-Glu	
385 390 395	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

110-21-98

aaa gaa gcc ttc aga gag gac ctt cat aac agg atg ctt cta tgg cat 1247
 Lys Glu Ala Phe Arg Glu Asp Leu His Asn Arg Met Leu Leu Trp His
 400 405 410 415

 ggt tcc agg atg agt aac tgg gtg gga atc ttg agc cat ggg ctt cga 1295
 Gly Ser Arg Met Ser Asn Trp Val Gly Ile Leu Ser His Gly Leu Arg
 420 425 430

 att gcc cca cct gaa gct ccc atc aca ggt tac atg ttt ggg aaa gga 1343
 Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys Gly
 435 440 445

 atc tac ttt gct gac atg tct tcc aag agt gcc aat tac tgc ttt gcc 1391
 Ile Tyr Phe Ala Asp Met Ser Ser Lys Ser Ala Asn Tyr Cys Phe Ala
 450 455 460

 tct cgc cta aag aat aca gga ctg ctg ctc tta tca gag gta gct cta 1439
 Ser Arg Leu Lys Asn Thr Gly Leu Leu Leu Ser Glu Val Ala Leu
 465 470 475

 ggt cag tgt aat gaa cta cta gag gcc aat cct aag gcc gaa gga ttg 1487
 Gly Gln Cys Asn Glu Leu Leu Glu Ala Asn Pro Lys Ala Glu Gly Leu
 480 485 490 495

 ctt caa ggt aaa cat agc acc aag ggg ctg ggc aag atg gct ccc agt 1535
 Leu Gln Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Met Ala Pro Ser
 500 505 510

 tct gcc cac ttc gtc acc ctg aat ggg agt aca gtg cca tta gga cca 1583
 Ser Ala His Phe Val Thr Leu Asn Gly Ser Thr Val Pro Leu Gly Pro
 515 520 525

 gca agt gac aca gga att ctg aat cca gat ggt tat acc ctc aac tac 1631
 Ala Ser Asp Thr Gly Ile Leu Asn Pro Asp Gly Tyr Thr Leu Asn Tyr
 530 535 540

 aat gaa tat att gta tat aac ccc aac cag gtc cgt atg cgg tac ctt 1679
 Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Pro Asn Gln Val Arg Met Arg Tyr Leu
 545 550 555

 tta aag gtt cag ttt aat ttc ctt cag ctg tgg tga atgttgat 1725
 Leu Lys Val Gln Phe Asn Phe Leu Gln Leu Trp
 560 565 570

 taaataaacc agagatctga tcttcaagca agaaaataag cagtgtgtta cttgtgaatt 1785
 ttgtgtatatt ttatgtataaaa aaaactgtac aggtctaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 1843

 <210> 2
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> Brain

 <400> 2
 Met Ala Ala Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg Ala
 1 5 10 15

 Leu Asn Glu Ser Lys Arg Val Asn Asn Gly Asn Thr Ala Pro Glu Asp
 20 25 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ser Ser Pro Ala Lys Lys Thr Arg Arg Cys Gln Arg Gln Glu Ser Lys
 35 40 45

Lys Met Pro Val Ala Gly Gly Lys Ala Asn Lys Asp Arg Thr Glu Asp
 50 55 60

Lys Gln Asp Glu Ser Val Lys Ala Leu Leu Leu Lys Gly Lys Ala Pro
 65 70 75 80

Val Asp Pro Glu Cys Thr Ala Lys Val Gly Lys Ala His Val Tyr Cys
 85 90 95

Glu Gly Asn Asp Val Tyr Asp Val Met Leu Asn Gln Thr Asn Leu Gln
 100 105 110

Phe Asn Asn Asn Lys Tyr Tyr Leu Ile Gln Leu Leu Glu Asp Asp Ala
 115 120 125

Gln Arg Asn Phe Ser Val Trp Met Arg Trp Gly Arg Val Gly Lys Met
 130 135 140

Gly Gln His Ser Leu Val Ala Cys Ser Gly Asn Leu Asn Lys Ala Lys
 145 150 155 160

Glu Ile Phe Gln Lys Lys Phe Leu Asp Lys Thr Lys Asn Asn Trp Glu
 165 170 175

Asp Arg Glu Lys Phe Glu Lys Val Pro Gly Lys Tyr Asp Met Leu Gln
 180 185 190

Met Asp Tyr Ala Thr Asn Thr Gln Asp Glu Glu Glu Thr Lys Lys Glu
 195 200 205

Glu Ser Leu Lys Ser Pro Leu Lys Pro Glu Ser Gln Leu Asp Leu Arg
 210 215 220

Val Gln Glu Leu Ile Lys Leu Ile Cys Asn Val Gln Ala Met Glu Glu
 225 230 235 240

Met Met Met Glu Met Lys Tyr Asn Thr Lys Lys Ala Pro Leu Gly Lys
 245 250 255

Leu Thr Val Ala Gln Ile Lys Ala Gly Tyr Gln Ser Leu Lys Lys Ile
 260 265 270

Glu Asp Cys Ile Arg Ala Gly Gln His Gly Arg Ala Leu Met Glu Ala
 275 280 285

Cys Asn Glu Phe Tyr Thr Arg Ile Pro His Asp Phe Gly Leu Arg Thr
 290 295 300

Pro Pro Leu Ile Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys Ile Gln Leu
 305 310 315 320

Leu Glu Ala Leu Gly Asp Ile Glu Ile Ala Ile Lys Leu Val Lys Thr
 325 330 335

Glu Leu Gln Ser Pro Glu His Pro Leu Asp Gln His Tyr Arg Asn Leu
 340 345 350

His Cys Ala Leu Arg Pro Leu Asp His Glu Ser Tyr Glu Phe Lys Val
 355 360 365

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Ser Thr His Ala Pro Thr His Ser Asp Tyr
 370 375 380

Thr Met Thr Leu Leu Asp Leu Phe Glu Val Glu Lys Asp Gly Glu Lys
 385 390 395 400

Glu Ala Phe Arg Glu Asp Leu His Asn Arg Met Leu Leu Trp His Gly
 405 410 415

Ser Arg Met Ser Asn Trp Val Gly Ile Leu Ser His Gly Leu Arg Ile
 420 425 430

Ala Pro Pro Glu Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys Gly Ile
 435 440 445

Tyr Phe Ala Asp Met Ser Ser Lys Ser Ala Asn Tyr Cys Phe Ala Ser
 450 455 460

Arg Leu Lys Asn Thr Gly Leu Leu Leu Ser Glu Val Ala Leu Gly
 465 470 475 480

Gln Cys Asn Glu Leu Leu Glu Ala Asn Pro Lys Ala Glu Gly Leu Leu
 485 490 495

Gln Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Met Ala Pro Ser Ser
 500 505 510

Ala His Phe Val Thr Leu Asn Gly Ser Thr Val Pro Leu Gly Pro Ala
 515 520 525

Ser Asp Thr Gly Ile Leu Asn Pro Asp Gly Tyr Thr Leu Asn Tyr Asn
 530 535 540

Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Pro Asn Gln Val Arg Met Arg Tyr Leu Leu
 545 550 555 560

Lys Val Gln Phe Asn Phe Leu Gln Leu Trp
 565 570

)
 <210> 3
 <211> 2265
 <212> DNA
 <213> Uterus

<220>
 <221> CDS
 <222> (242)...(1843)
 <223> Product=Poly ADP Ribose Polymerase

<400> 3
 tgggactggc cgcctgactc ggccctgcccc agcctctgct tcaccccaact ggtggccaaa 60
 tagccgatgt ctaatcccccc acacaagctc atccccggcc tctgggattt ttgggaattt 120
 tctccctaat tcacgcctga ggctcatgga gagttgcttag acctgggact gcccctggag 180
 gcgcacacaa ccaggccggg tggcagccag gacctctccc atgtccctgc ttttcttggc 240
 c atg gct cca aag ccg aag ccc tgg gta cag act gag ggc cct gag aag 289
 Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro Glu Lys
 1 5 10 15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

aag aag ggc cgg cag gca gga agg gag gag gac ccc ttc cgc tcc acc 337
 Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg Ser Thr
 20 25 30

gct gag gcc ctc aag gcc ata ccc gca gag aag cgc ata atc cgc gtg 385
 Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile Arg Val
 35 40 45

gat cca aca tgt cca ctc agc agc aac ccc ggg acc cag gtg tat gag 433
 Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val Tyr Glu
 50 55 60

gac tac aac tgc acc ctg aac cag acc aac atc gag aac aac aac aac 481
 Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn Asn Asn
 65 70 75 80

aag ttc tac atc atc cag ctg ctc caa gac agc aac cgc ttc ttc acc 529
 Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe Phe Thr
 85 90 95

tgc tgg aac cgc tgg ggc cgt gtg gga gag gtc ggc cag tca aag atc 577
 Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Ile
 100 105 110

aac cac ttc aca agg cta gaa gat gca aag aag gac ttt gag aag aaa 625
 Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu Lys Lys
 115 120 125

ttt cgg gaa aag acc aag aac aac tgg gca gag cgg gac cac ttt gtg 673
 Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His Phe Val
 130 135 140

tct cac ccg ggc aag tac aca ctt atc gaa gta cag gca gag gat gag 721
 Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu Asp Glu
 145 150 155 160

gcc cag gaa gct gtg gtg aag gtg gac aga ggc cca gtg agg act gtg 769
 Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp Arg Gly Pro Val Arg Thr Val
 165 170 175

act aag cgg gtg cag ccc tgc tcc ctg gac cca gcc acg cag aag ctc 817
 Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Lys Leu
 180 185 190

atc act aac atc ttc agc aag gag atg ttc aag aac acc atg gcc ctc 865
 Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Thr Met Ala Leu
 195 200 205

atg gac ctg gat gtg aag aag atg ccc ctg gga aag ctg agc aag caa 913
 Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser Lys Gln
 210 215 220

cag att gca cgg ggt ttc gag gcc ttg gag gcg ctg gag gag gcc ctg 961
 Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Ala Leu
 225 230 235 240

aaa ggc ccc acg gat ggt ggc caa agc ctg gag gag ctg tcc tca cac 1009
 Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser His
 245 250 255

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ttt tac acc gtc atc ccg cac aac ttc ggc cac agc cag ccc ccg ccc 1057
 Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly His Ser Gln Pro Pro Pro
 260 265 270

atc aat tcc cct gag ctt ctg cag gcc aag aag gac atg ctg ctg gtg 1105
 Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val
 275 280 285

ctg gcg gac atc gag ctg gcc cag gcc ctg cag gca gtc tct gag cag 1153
 Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala Leu Gln Ala Val Ser Glu Gln
 290 295 300

gag aag acg gtg gag gag gtg cca cac ccc ctg gac cga gac tac cag 1201
 Glu Lys Thr Val Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln
 305 310 315 320

ctt ctc aag tgc cag ctg cag ctg cta gac tct gga gca cct gag tac 1249
 Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Asp Ser Gly Ala Pro Glu Tyr
 325 330 335

aag gtg ata cag acc tac tta gaa cag act ggc agc aac cac agg tgc 1297
 Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln Thr Gly Ser Asn His Arg Cys
 340 345 350

cct aca ctt caa cac atc tgg aaa gta aac caa gaa ggg gag gaa gac 1345
 Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val Asn Gln Glu Gly Glu Glu Asp
 355 360 365

aga ttc cag gcc cac tcc aaa ctg ggt aat cgg aag ctg ctg tgg cat 1393
 Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Lys Leu Leu Trp His
 370 375 380

ggc acc aac atg gcc gtg gtg gcc gcc atc ctc act agt ggg ctc cgc 1441
 Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg
 385 390 395 400

atc atg cca cat tct ggt ggg cgt gtt ggc aag ggc atc tac ttt gcc 1489
 Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala
 405 410 415

tca gag aac agc aag tca gct gga tat gtt att ggc atg aag tgt ggg 1537
 Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Ile Gly Met Lys Cys Gly
 420 425 430

gcc cac cat gtc ggc tac atg ttc ctg ggt gag gtg gcc ctg ggc aga 1585
 Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Arg
 435 440 445

gag cac cat atc aac acg gac aac ccc agc ttg aag agc cca cct cct 1633
 Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro
 450 455 460

ggc ttc gac agt gtc att gcc cga ggc cac acc gag cct gat ccg acc 1681
 Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp Pro Thr
 465 470 475 480

cag gac act gag ttg gag ctg gat ggc cag caa gtg gtg gtg ccc cag 1729
 Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Pro Gln
 485 490 495

ggc cag cct gtg ccc tgc cca gag ttc agc agc tcc aca ttc tcc cag 1777
 Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe Ser Gln
 500 505 510

THIS PAGE BLANK (USPTO)

agc gag tac ctc atc tac cag gag agc cag tgt cgc ctg cgc tac ctg 1825
 Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu
 515 520 525

ctg gag gtc cac ctc tga gtgcccggcc tgcgggggg ggtcctgcaa 1873
 Leu Glu Val His Leu
 530

ggctggactg tgatcttcaa tcatcctgcc catctctggt acccctatat cactccttt 1933
 tttcaagaat acaatacggt gttgttaact atagtcacca tgctgtacaa gatccctgaa 1993
 cttatgcctc ctaactgaaa tttgtattc tttgacacat ctgcccagtc cctctctcc 2053
 cagccccatgg taaccagcat ttgactcttt acttgtataa gggcagcttt tatagggcc 2113
 acatgttaagt gagatcatgc agtgtttgtc tttctgtgcc tggcttattt cactcagcat 2173
 aatgtgcacc gggttcaccc atgtttcat aaatgacaag atttcctctt taaaaaaaaa 2233
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2265

<210> 4
 <211> 533
 <212> PRT
 <213> Uterus

<400> 4
 Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro Glu Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg Ser Thr
 20 25 30

Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile Arg Val
 35 40 45

Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val Tyr Glu
 50 55 60

Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn Asn Asn
 65 70 75 80

Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe Phe Thr
 85 90 95

Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Ile
 100 105 110

Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu Lys Lys
 115 120 125

Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His Phe Val
 130 135 140

Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu Asp Glu
 145 150 155 160

Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp Arg Gly Pro Val Arg Thr Val
 165 170 175

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Lys Leu
 180 185 190
 Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Thr Met Ala Leu
 195 200 205
 Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser Lys Gln
 210 215 220
 Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Ala Leu
 225 230 235 240
 Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser His
 245 250 255
 Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly His Ser Gln Pro Pro Pro
 260 265 270
 Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val
 275 280 285
 Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala Leu Gln Ala Val Ser Glu Gln
 290 295 300
 Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln
 305 310 315 320
 Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Ala Pro Glu Tyr
 325 330 335
 Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln Thr Gly Ser Asn His Arg Cys
 340 345 350
 Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val Asn Gln Glu Gly Glu Glu Asp
 355 360 365
 Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Lys Leu Leu Trp His
 370 375 380
 Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg
 385 390 395 400
 Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala
 405 410 415
 Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Ile Gly Met Lys Cys Gly
 420 425 430
 Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Arg
 435 440 445
 Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro
 450 455 460
 Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp Pro Thr
 465 470 475 480
 Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Val Pro Gln
 485 490 495
 Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe Ser Gln
 500 505 510

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu
515 520 525

Leu Glu Val His Leu
530

<210> 5
<211> 2265
<212> DNA
<213> Uterus

<220>
<221> CDS
<222> (221)..(1843)
<223> Product=Poly ADP Ribose Polymerase

<400> 5
tgggactgggt cgcctgactc ggccctgcccc agcctctgct tcaccccaact ggtggccaaa 60

) tagccgatgt ctaatccccc acacaagctc atccccggcc tctgggattt ttgggaattt 120
tctccctaat tcacgcctga ggctcatgga gagttgcttag acctgggact gcccctgggag 180
gcccacacaa ccaggccggg tggcagccag gacctctccc atg tcc ctg ctt ttc 235
Met Ser Leu Leu Phe
1 5

ttg gcc atg gct cca aag ccg aag ccc tgg gta cag act gag ggc cct 283
Leu Ala Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro
10 15 20

) gag aag aag aag ggc cgg cag gca gga agg gag gag gac ccc ttc cgc 331
Glu Lys Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg
25 30 35

tcc acc gct gag gcc ctc aag gcc ata ccc gca gag aag cgc ata atc 379
Ser Thr Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile
40 45 50

) cgc gtg gat cca aca tgt cca ctc agc agc aac ccc ggg acc cag gtg 427
Arg Val Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val
55 60 65

tat gag gac tac aac tgc acc ctg aac cag acc aac atc gag aac aac 475
Tyr Glu Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn
70 75 80 85

aac aac aag ttc tac atc atc cag ctg ctc caa gac agc aac cgc ttc 523
Asn Asn Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe
90 95 100

ttc acc tgc tgg aac cgc tgg ggc cgt gtg gga gag gtc ggc cag tca 571
Phe Thr Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser
105 110 115

aag atc aac cac ttc aca agg cta gaa gat gca aag aag gac ttt gag 619
Lys Ile Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu
120 125 130

THIS PAGE BLANK (USPTO)

aag aaa ttt cgg gaa aag acc aag aac aac tgg gca gag cgg gac cac 667
 Lys Lys Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His
 135 140 145

ttt gtg tct cac ccg ggc aag tac aca ctt atc gaa gta cag gca gag 715
 Phe Val Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu
 150 155 160 165

gat gag gcc cag gaa gct gtg gtg aag gtg gac aga ggc cca gtg agg 763
 Asp Glu Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp Arg Gly Pro Val Arg
 170 175 180

act gtg act aag cgg gtg cag ccc tgc tcc ctg gac cca gcc acg cag 811
 Thr Val Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln
 185 190 195

aag ctc atc act aac atc ttc agc aag gag atg ttc aag aac acc atg 859
 Lys Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Thr Met
 200 205 210

) gcc ctc atg gac ctg gat gtg aag aag atg ccc ctg gga aag ctg agc 907
 Ala Leu Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser
 215 220 225

aag caa cag att gca cgg ggt ttc gag gcc ttg gag gcg ctg gag gag 955
 Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu
 230 235 240 245

) gcc ctg aaa ggc ccc acg gat ggt ggc caa agc ctg gag gag ctg tcc 1003
 Ala Leu Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser
 250 255 260

tca cac ttt tac acc gtc atc ccg cac aac ttc ggc cac agc cag ccc 1051
 Ser His Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly His Ser Gln Pro
 265 270 275

) ccg ccc atc aat tcc cct gag ctt ctg cag gcc aag aag gac atg ctg 1099
 Pro Pro Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu
 280 285 290

) ctg gtg ctg gcg gac atc gag ctg gcc cag gcc ctg cag gca gtc tct 1147
 Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala Leu Gln Ala Val Ser
 295 300 305

gag cag gag aag acg gtg gag gag ggt gca cac ccc ctg gac cga gac 1195
 Glu Gln Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp
 310 315 320 325

tac cag ctt ctc aag tgc cag ctg cag ctg cta gac tct gga gca cct 1243
 Tyr Gln Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Ala Pro
 330 335 340

gag tac aag gtg ata cag acc tac tta gaa cag act ggc agc aac cac 1291
 Glu Tyr Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln Thr Gly Ser Asn His
 345 350 355

agg tgc cct aca ctt caa cac atc tgg aaa gta aac caa gaa ggg gag 1339
 Arg Cys Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val Asn Gln Glu Gly Glu
 360 365 370

gaa gac aga ttc cag gcc cac tcc aaa ctg ggt aat cgg aag ctg ctg 1387
 Glu Asp Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Lys Leu Leu
 375 380 385

THIS PAGE BLANK (USPTO)

tgg cat ggc acc aac atg gcc gtc gtc gtc gtc atc ctc act agt ggg 1435
 Trp His Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly
 390 395 400 405
 ctc cgc atc atg cca cat tct ggt ggg cgt gtt ggc aag ggc atc tac 1483
 Leu Arg Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr
 410 415 420
 ttt gcc tca gag aac agc aag tca gct gga tat gtt att ggc atg aag 1531
 Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Ile Gly Met Lys
 425 430 435
 tgt ggg gcc cac cat gtc ggc tac atg ttc ctg ggt gag gtc ggc ctg 1579
 Cys Gly Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu
 440 445 450
 ggc aga gag cac cat atc aac acg gac aac ccc agc ttg aag agc cca 1627
 Gly Arg Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro
 455 460 465
) cct cct ggc ttc gac agt gtc att gcc cga ggc cac acc gag cct gat 1675
 Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp
 470 475 480 485
 ccg acc cag gac act gag ttg gag ctg gat ggc cag caa gtc gtc gtc 1723
 Pro Thr Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Val
 490 495 500
 ccc cag ggc cag cct gtc ccc tgc cca gag ttc agc agc tcc aca ttc 1771
 Pro Gln Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe
 505 510 515
 tcc cag agc gag tac ctc atc tac cag gag agc cag tgt cgc ctg cgc 1819
 Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg
 520 525 530
) tac ctg ctg gag gtc cac ctc tga gtcccccccc tgcgtttttt ggtccctgcaa 1873
 Tyr Leu Leu Glu Val His Leu
 535 540
 ggctggactg tgcgtttcaa tcatactgcc catctctggt acccctatat cactcccttt 1933
 tttcaagaat acaatacggtt gttgttaact atagtcacca tgctgtacaa gatccctgaa 1993
 cttatgcctc ctaactgaaa tttgttattc tttgacacat ctggccagtc cctctctcc 2053
 cagcccatgg taaccagcat ttgactctt acttgtataa gggcagcttt tataggttcc 2113
 acatgttaagt gagatcatgc agtgtttgtc tttctgtgcc tggcttattt cactcagcat 2173
 aatgtgcacc gggttcaccc atgttttcat aaatgacaag atttccttctt taaaaaaaaa 2233
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2265

<210> 6
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> Uterus

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 6

Met	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Ala	Met	Ala	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Trp	Val
1				5			10							15	

Gln	Thr	Glu	Gly	Pro	Glu	Lys	Lys	Gly	Arg	Gln	Ala	Gly	Arg	Glu
				20			25						30	

Glu	Asp	Pro	Phe	Arg	Ser	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Lys	Ala	Ile	Pro	Ala
				35			40						45		

Glu	Lys	Arg	Ile	Ile	Arg	Val	Asp	Pro	Thr	Cys	Pro	Leu	Ser	Ser	Asn
				50			55					60			

Pro	Gly	Thr	Gln	Val	Tyr	Glu	Asp	Tyr	Asn	Cys	Thr	Leu	Asn	Gln	Thr
				65			70				75			80	

Asn	Ile	Glu	Asn	Asn	Asn	Lys	Phe	Tyr	Ile	Ile	Gln	Leu	Leu	Gln
				85			90				95			

Asp	Ser	Asn	Arg	Phe	Phe	Thr	Cys	Trp	Asn	Arg	Trp	Gly	Arg	Val	Gly
				100			105					110			

Glu	Val	Gly	Gln	Ser	Lys	Ile	Asn	His	Phe	Thr	Arg	Leu	Glu	Asp	Ala
				115			120				125				

Lys	Lys	Asp	Phe	Glu	Lys	Lys	Phe	Arg	Glu	Lys	Thr	Lys	Asn	Asn	Trp
				130			135				140				

Ala	Glu	Arg	Asp	His	Phe	Val	Ser	His	Pro	Gly	Lys	Tyr	Thr	Leu	Ile
				145			150				155			160	

Glu	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Gln	Glu	Ala	Val	Val	Lys	Val	Asp
				165			170				175				

Arg	Gly	Pro	Val	Arg	Thr	Val	Thr	Lys	Arg	Val	Gln	Pro	Cys	Ser	Leu
				180			185					190			

Asp	Pro	Ala	Thr	Gln	Lys	Leu	Ile	Thr	Asn	Ile	Phe	Ser	Lys	Glu	Met
				195			200				205				

Phe	Lys	Asn	Thr	Met	Ala	Leu	Met	Asp	Leu	Asp	Val	Lys	Lys	Met	Pro
				210			215				220				

Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Lys	Gln	Gln	Ile	Ala	Arg	Gly	Phe	Glu	Ala	Leu
				225			230				235			240	

Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Leu	Lys	Gly	Pro	Thr	Asp	Gly	Gly	Gln	Ser
				245			250					255			

Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	His	Phe	Tyr	Thr	Val	Ile	Pro	His	Asn	Phe
				260			265				270				

Gly	His	Ser	Gln	Pro	Pro	Ile	Asn	Ser	Pro	Glu	Leu	Leu	Gln	Ala
				275			280				285			

Lys	Lys	Asp	Met	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	Ala	Gln	Ala
				290			295				300				

Leu	Gln	Ala	Val	Ser	Glu	Gln	Glu	Lys	Thr	Val	Glu	Glu	Val	Pro	His
				305			310				315			320	

Pro	Leu	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gln	Leu	Leu	Lys	Cys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu
				325			330				335				

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Asp Ser Gly Ala Pro Glu Tyr Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln
 340 345 350

Thr Gly Ser Asn His Arg Cys Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val
 355 360 365

Asn Gln Glu Gly Glu Glu Asp Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly
 370 375 380

Asn Arg Lys Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala
 385 390 395 400

Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val
 405 410 415

Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr
 420 425 430

Val Ile Gly Met Lys Cys Gly Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu
 435 440 445

Gly Glu Val Ala Leu Gly Arg Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro
 450 455 460

Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly
 465 470 475 480

His Thr Glu Pro Asp Pro Thr Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly
 485 490 495

Gln Gln Val Val Val Pro Gln Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe
 500 505 510

Ser Ser Ser Thr Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser
 515 520 525

Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Val His Leu
 530 535 540

<210> 7

<211> 1740

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (112)..(1710)

<400> 7

ccgggttttc actttttctg ctgcctcgaa gaaacacctcg agccaaactgc ttccctaactc 60

agggtgggca gaactgacgg gatctaagct tctgcatctc tgaggagaac c atg gct 117
 Met Ala
 1

cca aaa cga aag gcc tct gtg cag act gag ggc tcc aag aag cag cga 165
 Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys Gln Arg
 5 10 15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

caa ggg aca gag gag gac agc ttc cgg tcc act gcc gag gct ctc 213
 Gln Gly Thr Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu Ala Leu
 20 25 30

aga gca gca cct gct gat aat cgg gtc atc cgt gtg gac ccc tca tgt 261
 Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro Ser Cys
 35 40 45 50

cca ttc agc cgg aac ccc ggg ata cag gtc cac gag gac tat gac tgt 309
 Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr Asp Cys
 55 60 65

acc ctg aac cag acc aac atc ggc aac aac aac aag ttc tat att 357
 Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Lys Phe Tyr Ile
 70 75 80

atc caa ctg ctg gag gag ggt agt cgc ttc ttc tgc tgg aat cgc tgg 405
 Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn Arg Trp
 85 90 95

ggc cgc gtg gga gag gtg ggc cag agc aag atg aac cac ttc acc tgc 453
 Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe Thr Cys
 100 105 110

ctg gaa gat gca aag aag gac ttt aag aag aaa ttt tgg gag aag act 501
 Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Phe Trp Glu Lys Thr
 115 120 125 130

aaa aac aaa tgg gag gag cgg gac cgt ttt gtg gcc cag ccc aac aag 549
 Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro Asn Lys
 135 140 145

tac aca ctt ata gaa gtc cag gga gaa gca gag agc caa gag gct gta 597
 Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu Ala Val
 150 155 160

gtg aag gcc tta tct ccc cag gtg gac agc ggc cct gtg agg acc gtg 645
 Val Lys Ala Leu Ser Pro Gln Val Asp Ser Gly Pro Val Arg Thr Val
 165 170 175

gtc aag ccc tgc tcc cta gac cct gcc acc cag aac ctt atc acc aac 693
 Val Lys Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile Thr Asn
 180 185 190

atc ttc agc aaa gag atg ttc aag aac gca atg acc ctc atg aac ctg 741
 Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met Asn Leu
 195 200 205 210

gat gtg aag aag atg ccc ttg gga aag ctg acc aag cag cag att gcc 789
 Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln Ile Ala
 215 220 225

cgt ggc ttc gag gcc ttg gaa gct cta gag gag gcc atg aaa aac ccc 837
 Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Met Lys Asn Pro
 230 235 240

aca ggg gat ggc cag agc ctg gaa gag ctc tcc tgc ttc tac act 885
 Thr Gly Asp Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr
 245 250 255

gtc atc cca cac aac ttc ggc cgc agc cga ccc ccc atc aac tcc 933
 Val Ile Pro His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile Asn Ser
 260 265 270

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cct gat gtg ctt cag gcc aag aag gac atg ctg ctg gtg cta gcg gac 981
 Pro Asp Val Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp
 275 280 285 -290

 atc gag ttg gcg cag acc ttg Cag gca gcc cct ggg gag gag gag 1029
 Ile Glu Leu Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu
 295 300 305

 aaa gtg gaa gag gtg cca cac cca ctg gat cga gac tac cag ctc ctc 1077
 Lys Val Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu
 310 315 320

 agg tgc cag ctt caa ctg ctg gac tcc ggg gag tcc gag tac aag gca 1125
 Arg Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala
 325 330 335

 ata cag acc tac ctg aaa cag act ggc aac agc tac agg tgc cca aac 1173
 Ile Gln Thr Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn
 340 345 350

 ctg cgg cat gtt tgg aaa gtg aac cga gaa ggg gag gga gac agg ttc 1221
 Leu Arg His Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe
 355 360 365 370

 cag gcc cac tcc aaa ctg ggc aat cgg agg ctg ctg tgg cac ggc acc 1269
 Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr
 375 380 385

 aat gtg gcc gtg gtc gtc atc ctc acc agt ggg ctc cga atc atg 1317
 Asn Val Ala Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met
 390 395 400

 cca cac tcg ggt ggt cgt gtt ggc aag ggt att tat ttt gcc tct gag 1365
 Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu
 405 410 415

 aac agc aag tca gct ggc tat gtt acc acc atg cac tgc ggg ggc cac 1413
 Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His
 420 425 430

 cag gtg ggc tac atg ttc ctg ggc gag gtg gcc ctc ggc aaa gag cac 1461
 Gln Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His
 435 440 445 450

 cac atc acc atc gat gac ccc agc ttg aag agt cca ccc cct ggc ttt 1509
 His Ile Thr Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe
 455 460 465

 gac agc gtc atc gcc cga ggc caa acc gag ccg gat ccc gcc cag gac 1557
 Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp
 470 475 480

 att gaa ctt gaa ctg gat ggg cag ccg gtg gtg ccc caa ggc ccg 1605
 Ile Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro
 485 490 495

 cct gtg cag tgc ccg tca ttc aaa agc tcc agc ttc agc cag agt gaa 1653
 Pro Val Gln Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu
 500 505 510

THIS PAGE BLANK (USPTO)

tac ctc ata tac aag gag agc cag tgc cgc ctg cgc tac ctg ctg gag 1701
 Tyr Leu Ile Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu
 515 520 525 530

att cac ctc taagctgctt gccctcccta ggtccaaagcc 1740
 Ile His Leu

<210> 8
 <211> 533
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8
 Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys 1 5 10 15
 Gln Arg Gln Gly Thr Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu 20 25 30

Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro 35 40 45

Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr 50 55 60

Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe 65 70 75 80

Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn 85 90 95

Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe 100 105 110

Thr Cys Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Phe Trp Glu 115 120 125

Lys Thr Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro 130 135 140

Asn Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu 145 150 155 160

Ala Val Val Lys Ala Leu Ser Pro Gln Val Asp Ser Gly Pro Val Arg 165 170 175

Thr Val Val Lys Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile 180 185 190

Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met 195 200 205

Asn Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln 210 215 220

Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Ala Met Lys 225 230 235 240

Asn Pro Thr Gly Asp Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe 245 250 255

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile
 260 265 270

Asn Ser Pro Asp Val Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu
 275 280 285

Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gin Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu
 290 295 300

Glu Glu Lys Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln
 305 310 315 320

Leu Leu Arg Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr
 325 330 335

Lys Ala Ile Gln Thr Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys
 340 345 350

Pro Asn Leu Arg His Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp
 355 360 365

Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His
 370 375 380

Gly Thr Asn Val Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg
 385 390 395 400

Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala
 405 410 415

Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly
 420 425 430

Gly His Gln Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys
 435 440 445

Glu His His Ile Thr Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro
 450 455 460

Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala
 465 470 475 480

Gln Asp Ile Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln
 485 490 495

Gly Pro Pro Val Gln Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln
 500 505 510

Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu
 515 520 525

Leu Glu Ile His Leu
 530

<210> 9
 <211> 1587
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

--<220>
 <221> CDS

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11.10.11.90

<222> (1)..(1584)

<400> 9

atg gct cca aaa cga aag gcc tct gtg cag act gag ggc tcc aag aag 48
 Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys
 1 5 10 15

cag cga caa ggg aca gag gag gac agc ttc cgg tcc act gcc gag 96
 Gln Arg Gln Gly Thr Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu
 20 25 30

gct ctc aga gca gca cct gct gat aat cgg gtc atc cgt gtg gac ccc 144
 Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro
 35 40 45

tca tgt cca ttc agc cgg aac ccc ggg ata cag gtc cac gag gac tat 192
 Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr
 50 55 60

gac tgt acc ctg aac cag acc aac atc ggc aac aac aac aac aag ttc 240
 Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Lys Phe
 65 70 75 80

tat att atc caa ctg ctg gag gag ggt agt cgc ttc ttc tgc tgg aat 288
 Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn
 85 90 95

cgc tgg ggc cgc gtg gga gag gtg ggc cag agc aag atg aac cac ttc 336
 Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe
 100 105 110

acc tgc ctg gaa gat gca aag aag gac ttt aag aag aaa ttt tgg gag 384
 Thr Cys Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Phe Trp Glu
 115 120 125

aag act aaa aac aaa tgg gag gag cgg gac cgt ttt gtg gcc cag ccc 432
 Lys Thr Lys Asn Lys Trp Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro
 130 135 140

aac aag tac aca ctt ata gaa gtc cag gga gaa gca gag agc caa gag 480
 Asn Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu
 145 150 155 160

gct gta gtg aag gtg gac agc ggc cct gtg agg acc gtg gtc aag ccc 528
 Ala Val Val Lys Val Asp Ser Gly Pro Val Arg Thr Val Val Lys Pro
 165 170 175

tgc tcc cta gac cct gcc acc cag aac ctt atc acc aac atc ttc agc 576
 Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser
 180 185 190

aaa gag atg ttc aag aac gca atg acc ctc atg aac ctg gat gtg aag 624
 Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met Asn Leu Asp Val Lys
 195 200 205

aag atg ccc ttg gga aag ctg acc aag cag cag att gcc cgt ggc ttc 672
 Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe
 210 215 220

gag gcc ttg gaa gct cta gag gag gcc atg aaa aac ccc aca ggg gat 720
 Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Met Lys Asn Pro Thr Gly Asp
 225 230 235 240

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ggc cag agc ctg gaa gag ctc tcc tcc tgc ttc tac act gtc atc cca 768
 Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr Val Ile Pro
 245 250 255

cac aac ttc ggc cgc agc cga ccc ccg ccc atc aac tcc cct gat gtg 816
 His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Ile Asn Ser Pro Asp Val
 260 265 270

ctt cag gcc aag aag gac atg ctg ctg gtg cta gcg gac atc gag ttg 864
 Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu
 275 280 285

gcg cag acc ttg cag gca gcc cct ggg gag gag gag gag aaa gtg gaa 912
 Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu Lys Val Glu
 290 295 300

gag gtg cca cac cca ctg gat cga gac tac cag ctc ctc agg tgc cag 960
 Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu Arg Cys Gln
 305 310 315 320

ctt caa ctg ctg gac tcc ggg gag tcc gag tac aag gca ata cag acc 1008
 Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala Ile Gln Thr
 325 330 335

tac ctg aaa cag act ggc aac agc tac agg tgc cca aac ctg cgg cat 1056
 Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn Leu Arg His
 340 345 350

gtt tgg aaa gtg aac cga gaa ggg gag gga gac agg ttc cag gcc cac 1104
 Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe Gln Ala His
 355 360 365

tcc aaa ctg ggc aat cgg agg ctg ctg tgg cac ggc acc aat gtg gcc 1152
 Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Val Ala
 370 375 380

gtg gtg gct gcc atc ctc acc agt ggg ctc cga atc atg cca cac tcg 1200
 Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser
 385 390 395 400

ggt ggt cgt gtt ggc aag ggt att tat ttt gcc tct gag aac agc aag 1248
 Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys
 405 410 415

tca gct ggc tat gtt acc acc atg cac tgt ggg ggc cac cag gtg ggc 1296
 Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His Gln Val Gly
 420 425 430

tac atg ttc ctg ggc gag gtg gcc ctc ggc aaa gag cac cac atc acc 1344
 Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His His Ile Thr
 435 440 445

atc gat gac ccc agc ttg aag agt cca ccc cct ggc ttt gac agc gtc 1392
 Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val
 450 455 460

atc gcc cga ggc caa acc gag ccg gat ccc gcc cag gac att gaa ctt 1440
 Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp Ile Glu Leu
 465 470 475 480

gaa ctg gat ggg cag ccg gtg gtg ccc caa ggc ccg cct gtg cag 1488
 Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Pro Gln Gly Pro Pro Val Gln
 485 490 495

THIS PAGE BLANK (USPTO)

tgc ccg tca ttc aaa agc tcc agc ttc agc cag agt gaa tac ctc ata	1536
Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile	
500 505 510	
tac aag gag agc cag tgt cgc ctg cgc tac ctg ctg gag att cac ctc	1584
Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Ile His Leu	
515 520 525	
taa	1587
<210> 10	
<211> 528	
<212> PRT	
<213> Mus musculus	
<400> 10	
Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys	
1 5 10 15	
)	
Gln Arg Gln Gly Thr Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu	
20 25 30	
Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro	
35 40 45	
)	
Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr	
50 55 60	
Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe	
65 70 75 80	
)	
Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn	
85 90 95	
Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe	
100 105 110	
)	
Thr Cys Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Phe Trp Glu	
115 120 125	
)	
Lys Thr Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro	
130 135 140	
Asn Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu	
145 150 155 160	
)	
Ala Val Val Lys Val Asp Ser Gly Pro Val Arg Thr Val Val Lys Pro	
165 170 175	
)	
Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser	
180 185 190	
)	
Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met Asn Leu Asp Val Lys	
195 200 205	
)	
Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe	
210 215 220	
)	
Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Met Lys Asn Pro Thr Gly Asp	
225 230 235 240	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr Val Ile Pro
245 250 255

His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile Asn Ser Pro Asp Val
260 265 270

Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu
275 280 285

Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu Lys Val Glu
290 295 300

Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu Arg Cys Gln
305 310 315 320

Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala Ile Gln Thr
325 330 335

Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn Leu Arg His
340 345 350

Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe Gln Ala His
355 360 365

Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Val Ala
370 375 380

Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser
385 390 395 400

Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys
405 410 415

Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His Gln Val Gly
420 425 430

Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His His Ile Thr
435 440 445

Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val
450 455 460

Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp Ile Glu Leu
465 470 475 480

Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro Pro Val Gln
485 490 495

Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile
500 505 510

Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Ile His Leu
515 520 525

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> SITE

THIS PAGE BLANK (USPTO)

116-11-099
<222> (2)
<223> Xaa is 1 to 5 other amino acids

<220>
<221> SITE
<222> (3)
<223> Xaa is Thr or Ser

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 11
Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala
1 5 10

<210> 12
<211> 21
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Xaa is Ser or Thr

<220>
<221> SITE
<222> (6)
<223> Xaa is Ile or Val

<220>
<221> SITE
<222> (9)
<223> Xaa is 1 to 5 other amino acids

<220>
<221> SITE
<222> (10)
<223> Xaa is Ser or Thr

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 12
Xaa Xaa Gly Leu Arg Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Lys
1 5 10 15
Gly Ile Tyr Phe Ala
20

<210> 13
<211> 45
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>
 <221> SITE
 <222> (6)
 <223> Xaa is Ser or Thr

<220>
 <221> SITE
 <222> (16)
 <223> Xaa is Ser or Thr

<220>
 <221> SITE
 <222> (21)
 <223> Xaa is Ile or Val

<220>
 <221> SITE
 <222> (24)
 <223> Xaa is 1 to 5 other amino acids

<220>
 <221> SITE
 <222> (25)
 <223> Xaa is Ser or Thr

<400> 13
 Leu Leu Trp His Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Leu Xaa
 1 5 10 15

Xaa Gly Leu Arg Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Lys Gly
 20 25 30

Ile Tyr Phe Ala Xaa Xaa Xaa Ser Lys Ser Ala Xaa Tyr
 35 40 45

<210> 14
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)
 <223> Xaa is Leu or Val

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 14
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu
 20

<210> 15
 <211> 27
 <212> PRT--
 <213> Künstliche Sequenz

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>
 <221> SITE
 <222> (21)
 <223> Xaa is Asp or Glu

<220>
 <221> SITE
 <222> (22)
 <223> Xaa is 10 or 11 other amino acids

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 15

Leu	Xaa	Asn	Xaa	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa							
1									10				15	

Gln	Leu	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Gly	Arg	Val	Gly				
						20			25					

)
 <210> 16
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 16

Ala	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Xaa	Lys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Lys	Thr	Xaa	Asn	Xaa
1											10			15	

Trp	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Lys			
						20			25						

)
 <210> 17
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> SITE
 <222> (4)
 <223> Xaa is Ile or Leu

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 17

Gln	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Ile	Xaa							
1											10		15	

Met	Xaa	Pro	Leu	Gly	Lys	Leu								
										20	25		30	

Xaa	Xaa	Xaa	Gln	Ile	Xaa	Leu								
										35	40			

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1106-11-99

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 18
Phe Tyr Thr Xaa Ile Pro His Xaa Phe Gly Xaa Xaa Xaa Pro Pro
1 5 10 15

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 19
Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Leu Xaa Asp Ile Glu Xaa Ala Xaa Xaa
1 5 10 15

Leu

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 20
Gly Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Glu Val Ala Leu Gly
1 5 10

<210> 21
<211> 20
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<220>
<221> SITE
<222> (14)
<223> Xaa is 7 to 9 other amino acids

<400> 21
Gly Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Leu Xaa
1 5 10 15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gly Xaa Xaa Val
20

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<220>

<221> SITE

<222> (2)

<223> Xaa is Tyr or Phe

<400> 22

Glu Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Leu Leu
1 5 10 15

)<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 23

Met Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg Ala
1 5 10 15

Leu Asn Glu Ser
20

)<210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 24

Lys Thr Glu Leu Gln Ser Pro Glu His Pro Leu Asp Gln His Tyr Arg
1 5 10 15

Asn Leu His Cys
20

<210> 25

<211> 21

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 25

Cys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg Ser Thr
1 5 10 15Ala Glu Ala Leu Lys
20

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 26

Cys Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu
1 5 10 15Glu Ala Leu Lys
20

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 27

Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 28

Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu
1 5 10 15

Ala Met Lys

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patentansprüche

1. Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)-Homologes aus menschlichen
 5 oder nicht menschlichen Säugern, gekennzeichnet durch eine
 Aminosäuresequenz, welche
 a) eine funktionale NAD⁺-Bindungsdomäne und
 b) kein Zink-Finger-Sequenzmotiv der allgemeinen Formel

10

 $CX_2CX_mHX_2C$

15

aufweist, worin
 m für einen ganzzahligen Wert von 28 oder 30 steht und
 die Reste X unabhängig voneinander für eine beliebige
 Aminosäure stehen.

2. PARP-Homologes nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
 20 die funktionale NAD⁺-Bindungsdomäne eines der folgenden all-
 gemeinen Sequenzmotive umfaßt:

$PX_n(S/T)GX_3GKGIYFA$,
 $(S/T)XGLR(I/V)XPX_n(S/T)GX_3GKGIYFA$ oder
 $LLWHG(S/T)X_7IL(S/T)XGLR(I/V)XPX_n(S/T)GX_3GKGIYFAX_3SKSAXY$

25

worin
 n für einen ganzzahligen Wert von 1 bis 5 steht und die Reste
 X unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure ste-
 hen.

30

3. PARP-Homologes nach einem der vorherigen Ansprüche, umfassend
 wenigstens ein weiteres der folgenden Teilsequenz-Motive:

35

$LX_9NX_2YX_2QLLX(D/E)X_{10/11}WGRVG$,
 $AX_3FXKX_4KTXNXWX_5FX_3PKX$,
 $QXL(I/L)X_2IX_9MX_{10}PLGKLX_3QIX_6L$,
 $FYTXIPHXFGX_3PP$; und
 $KK_3LX_2LXDIEXAX_2L$,

40

worin die Reste X unabhängig voneinander für eine beliebige
 Aminosäure stehen.

45

4. PARP-Homologes nach einem der vorherigen Ansprüche, ausge-
 wählt unter humanen PARP-Homologen, gekennzeichnet durch die
 Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 (humanPARP2) oder SEQ ID
 NO:4 oder 6 (humanPARP3 Typ 1 bzw. 2); oder murinen PARP-Ho-
 mologen, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz gemäß SEQ

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ID NO:8 (mausPARP Langform) oder SEQ ID NO:10 (mausPARP Kurzform).

5. Bindungspartner mit Spezifität für PARP-Homologe nach einem der vorherigen Ansprüche, ausgewählt unter
 - a) Antikörpern und Fragmenten davon,
 - b) proteinartigen Verbindungen, welche mit einer Teilsequenz des Proteins wechselwirken, und
 - c) niedermolekularen Effektoren, welche die katalytische PARP-Aktivität oder eine andere biologische Funktion eines PARP-Moleküls modulieren.
10. Nukleinsäure, umfassend
 - a) eine für wenigstens ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodierende Nukleotidsequenz oder die komplementäre Nukleotidsequenz davon;
 - b) eine Nukleotidessequenz, die unter stringenten Bedingungen mit einer Sequenz gemäß a) hybridisiert; oder
 - c) Nukleotidsequenzen, die durch Entartung des genetischen Codes von den in a) und b) definierten Nukleotidsequenzen abgeleitet sind.
15. Nukleinsäure nach Anspruch 6, umfassend
 - a) die Nukleotide + 3 bis + 1715 gemäß SEQ ID NO:1;
 - b) die Nukleotide + 242 bis + 1843 gemäß SEQ ID NO:3;
 - c) die Nukleotide + 221 bis + 1843 gemäß SEQ ID NO:5;
 - d) die Nukleotide + 112 bis + 1710 gemäß SEQ ID NO:7; oder
 - e) die Nukleotide + 1 bis + 1584 gemäß SEQ ID NO:9.
20. Expressionskassette, enthaltend unter genetischer Kontrolle wenigstens einer regulativen Nukleotidsequenz wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß einem der Ansprüche 6 und 7.
25. 35. Rekombinanter Vektor, umfassend wenigstens eine Expressionskassette nach Anspruch 8.
30. 40. Rekombinanter Mikroorganismus, enthaltend wenigstens einen rekombinanten Vektor nach Anspruch 9.
45. 11. Transgener Säuger, enthaltend einen Vektor gemäß Anspruch 9.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12. PARP-defizienter Säuger oder PARP-defiziente eukaryontische Zelle, worin eine funktionale Expression wenigstens eines Gens inhibiert ist, das für ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodiert.

5

13. In vitro Nachweisverfahren für PARP-Inhibitoren dadurch gekennzeichnet, daß man

10 a) ein ungeträgertes oder geträgertes Poly-ADP-ribosylierbares Target mit einem Reaktionsgemisch inkubiert, umfassend

a1) ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4,

a2) einen PARP-Aktivator; und

15 a3) einen PARP-Inhibitor oder einen Analyten, in welchem man wenigstens einen PARP-Inhibitor vermutet;

b) die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durchführt; und

c) die Poly-ADP-Ribosylierung des Target qualitativ oder quantitativ bestimmt.

20 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass man das PARP-Homologe mit dem PARP-Aktivator und dem PARP-Inhibitor oder einen Analyten, in welchem man wenigstens einen PARP-Inhibitor vermutet, vorinkubiert, bevor man die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durchführt.

25

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 und 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Poly-ADP-ribosylierbare Target ein Histon-Protein ist.

30 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der PARP-Aktivator aktivierte DNA ist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass man die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durch 35 Zugabe von NAD^+ startet.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass man die Poly-ADP-Ribosylierung des geträgerten Target mit Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper bestimmt.

40

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das nichtgeträgerte Target mit einem Akzeptor-Fluorophor markiert ist.

45 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man die Poly-ADP-Ribosylierung des nicht geträgerten Target mit Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper bestimmt, der mit einem Do-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

nor-Fluorophor markiert ist, das zur Energieübertragung auf das Akzeptor-Fluorophor befähigt ist.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 und 20, dadurch gekenn-
5 zeichnet, dass das Target biotinyliertes Histon ist und das Akzeptor-Fluorophor über Avidin oder Streptavidin daran gekoppelt ist.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 und 21, dadurch gekenn-
10 zeichnet, dass der Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper ein Europium-Kryptat als Donor-Fluorophor trägt.

23. In vitro-Screeningverfahren auf Bindungspartner für ein PARP-Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß man
15 a1) wenigstens ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4 an einem Träger immobilisiert;
b1) das immobilisierte PARP-Homologe mit einem Analyten in Kontakt bringt, in welchem man wenigstens einen Bindungspartner vermutet; und
20 c1) an das immobilisierte PARP-Homologe gebundene Bestandteile des Analyten, gegebenenfalls nach einer Inkubationsphase, bestimmt;

oder
25 a2) einen Analyten, welcher wenigstens einen möglichen Bindungspartner für ein PARP-Molekül enthält, an einem Träger immobilisiert;
b2) den immobilisierten Analyten mit wenigstens einem PARP-Ho-
30 mologen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in Kontakt bringt, für welches man einen Bindungspartner sucht; und
c2) den immobilisierten Analyten, gegebenenfalls nach einer Inkubationsphase, auf die Bindung des PARP-Homologen untersucht.

35 24. Verfahren zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung von PARP-Homologe nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodierenden Nukleinsäuren, gekennzeichnet durch
a) Inkubation einer biologischen Probe mit einer definierten Menge einer exogenen Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6 und 7, Hybridisierung unter stringenten Bedingungen, Bestimmung der hybridisierenden Nukleinsäuren und gegebenenfalls Vergleich mit einem Standard; oder
40 b) Inkubation einer biologischen Probe mit einem Paar von Oligonucleotid-Primern mit Spezifität für ein PARP-Homologes kodierende Nukleinsäure, Amplifizierung der Nu-

45

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

kleinsäure, Bestimmung des Amplifikationsprodukts und gegebenenfalls Vergleich mit einem Standard.

25. Verfahren zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung eines PARP-Homologen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch

- Inkubation einer biologischen Probe mit einem für ein PARP-Homologes spezifischen Bindungspartner,
- Nachweis des Bindungspartner/PARP-Komplexes und gegebenenfalls
- Vergleich des Ergebnisses mit einem Standard.

10

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Bindungspartner ein Antikörper oder ein bindendes Fragment davon ist, der gegebenenfalls eine detektierbare Markierung trägt.

15

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26 zur Diagnostizierung von Energiedefizienz-vermittelten Erkrankungen.

20

28. Verfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit vom PARP-Effektoren, dadurch gekennzeichnet daß man

- ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4 mit einem Analyten inkubiert, welcher einen Effektor einer physiologischen oder pathologischen PARP-Aktivität enthält; den Effektor gegebenenfalls wieder abtrennt; und
- die Aktivität des PARP-Homologen, gegebenenfalls nach Zugebung von Substraten oder Cosubstraten, bestimmt.

25

30 29. Gentherapeutisches Mittel, dadurch gekennzeichnet, das es in einem gentherapeutisch akzeptablen Träger ein Nukleinsäurekonstrukt enthält, das

- eine Antisense-Nukleinsäure gegen eine kodierende Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6 und 7; oder
- ein Ribozym gegen eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6 und 7 umfasst; oder
- für einen spezifischen PARP-Inhibitor.

35

40 30. Pharmazeutisches Mittel, enthaltend in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger wenigstens ein PARP-Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wenigstens einen PARP-Bindungspartner nach Anspruch 5 oder wenigstens eine kodierende Nukleotidsequenz nach Anspruch 6 oder 7.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6

31. Verwendung niedermolekularer PARP-Bindungspartner nach An-
spruch 5 zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur
Diagnose oder Therapie von Krankheitszuständen, an deren Ent-
stehung und/oder Verlauf wenigstens ein PARP-Protein oder ein
5 davon abgeleitetes Polypeptid beteiligt ist.
32. Verwendung niedermolekularer PARP-Bindungspartner nach An-
spruch 5 zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur
Diagnose oder Therapie von Krankheitszuständen, die durch
10 eine Energiedefizienz vermittelt sind.

15 58/iT/cb

20

25

30

35

40

45

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/09/70/586

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference M/39113-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/03889	International filing date (day/month/year) 04 June 1999 (04.06.99)	Priority date (day/month/year) 05 June 1998 (05.06.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/10		
Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 10 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 34 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 22 December 1999 (22.12.99)	Date of completion of this report 13 October 2000 (13.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/03889**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

the international application as originally filed.

the description, pages _____, as originally filed,

pages _____, filed with the demand,

pages 1-48, filed with the letter of _____,

pages 49-76, filed with the letter of 16 November 1999 (16.11.1999),

the claims, Nos. _____, as originally filed,

Nos. _____, as amended under Article 19,

Nos. _____, filed with the demand,

Nos. 1-32, filed with the letter of 22 September 2000 (22.09.2000),

Nos. _____, filed with the letter of _____

the drawings, sheets/fig 1-7, as originally filed,

sheets/fig _____, filed with the demand,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages _____

the claims, Nos. _____

the drawings, sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/03889

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1, 2, 4, 5, 7-23, 25-28, 31, 32	YES
	Claims	6, 24, 29, 30	NO
Inventive step (IS)	Claims	2, 4, 7, 27, 31, 32	YES
	Claims	1, 5, 8-23, 25, 26, 28	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1, 2, 4-32	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The present report makes reference to the following documents:

D1: LEPINIEC L. ET AL.: 'Characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA homologue to animal poly(ADP-ribose)polymerase', FEBS LETTERS, vol. 364, 1995, pp. 103-108, XP000867423, cited in the application

D2: GRIFFIN R. J. ET AL.: 'NOVEL POTENT INHIBITORS OF THE DNA REPAIR ENZYME POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE (PARP)', ANTI-CANCER DRUG DESIGN, GB, BASINGSTOKE, vol. 10, no. 6, 1995, pp. 507-514, XP002065156, ISSN: 0266-9536, cited in the application

D3: KUEPPER J.-H. AND BUERKLE A.: 'EXPRESSION OF THE DNA-BINDING DOMAIN OF HUMAN POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE AS A TRANS-DOMINANT INHIBITOR OF POLY(ADP-RIBOSYL)ATION IN TRANSFECTED EUKARYOTIC CELL LINES', 1992, POIRIER, G.G. AND MOREAU P., EDS, SPRINGER, NEW YORK, XP000568905.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1. Novelty PCT Article 33(2)

1.1 D1 discloses a nucleic acid coding for the PARP homologue from *Arabidopsis thaliana*, cDNA, and southern blot and northern blot hybridizations for detecting same (cf. Figures 3 and 4). Said *Arabidopsis thaliana* PARP homologue has the structural features given in Claim 1. The indication of the origin of a protein, as added to the amended Claim 1, i.e. "from a human or non-human mammal", is not a feature which characterizes the chemical structure of a protein *per se*. The above wording of amended Claim 1 therefore does not distinguish the subject matter thereof with respect to the PARP homologues disclosed in D1. D1 is consequently prejudicial to the novelty of **Claims 6, 24 and 30**.

1.2 D3 discloses a vector coding for the DNA-binding domain of human PARP (p. 40, Figure 1). This domain constitutes a specific PARP inhibitor, such that D3 is prejudicial to the novelty of **Claim 29**.

2. Inventive step (PCT Article 33(3))

2.1 The *Arabidopsis thaliana* PARP homologue, included in Claim 1 and coded for by the nucleic acid known from D1, as well as antibodies specific thereto, are the result of what a person skilled in the art would routinely do according to the circumstances, without thereby exercising inventive skill. The same applies to the subjects of Claims 8-12, 25 and 26 insofar as said claims relate to the *Arabidopsis thaliana* PARP homologue. **Claims 1, 5, 8-12, 25 and 26** are therefore not inventive.

2.2 D2 (p. 509) discloses a method of detecting PARP

THIS PAGE BLANK (USPTO)

inhibitors of human PARP. Since histones are the natural targets for PARP proteins it is assumed that in said method the poly-ADP-ribosylable target is a histone protein. Said method of detection therefore comprises the process steps indicated in **Claims 13, 15-17 and 28**. The use of this method for the detection of inhibitors of the *Arabidopsis thaliana* PARP homologue would be an obvious step which a person skilled in the art would also carry out according to the circumstances. The modification described in **Claim 14** of the process steps as per D2 is a modification of enzymatic detection reactions which is routine in this field. The detection of poly-ADP-ribosylation by anti-poly-(ADP-ribose) antibodies is known from D3 (Figure 3). Carrying out said method of detecting PARP inhibitors by means of such antibodies would therefore be a modification of the method of D2 that is obvious to a person skilled in the art. The features described in **Claims 18-22** are routine methods used to render an antigen-antibody bond visible. **Claims 13-22 and 28** are therefore not inventive.

2.3 An in-vitro method of screening for binding partners for a protein coded for by a known nucleic acid, as described in Claim 23, is a routine method which a person skilled in the art would normally carry out according to the circumstances, without thereby exercising inventive skill. **Claim 23** is therefore not inventive.

3. Other comments

PARP homologues as per **Claim 2** and both human and murine PARP homologues and the nucleic acid sequences coding for same, as indicated in **Claims 4 and 7**, are not known from the prior art or suggested thereby in an obvious way. Said claims are therefore novel and appear to be inventive. This also applies to a diagnostic method as per **Claim 27**,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/03889

to the PARP-2-specific inhibitor 4-(N-(4-hydroxyphenyl)-aminomethyl)-(2H)-dihydrophthalazin-1-one (Claim 5c) and the use of said substance according to **Claims 31 and 32.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/03889

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

Continuation of: Box I.4.

The present report is based on pages 49-76 (i.e. the sequence protocol) of the description, submitted with the letter of 16 November 1999 and received on 16 November 1999.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

1. Binding partners with specificity for PARP homologues as per Claim 5 (b) per se are not disclosed in the present application and are not known from the prior art. It is therefore not possible to carry out a meaningful examination of the subject matter of said claim.

2. With the exception of 4-(N-(4-hydroxyphenyl)-aminomethyl)-(2H)-dihydrophthalazin-1-one, the application also fails to disclose any low-molecular effectors as per Claim 5(c) per se. Both Claim 5 and its dependent use Claims 31 and 32 can therefore be examined only to the extent that they relate to the above substance.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

Lack of unity of the invention

The following groups of inventions are not linked by a single general inventive concept:

Group 1: Claim 1 (in full); Claims 5, 6, 8-32 (in part).

A PARP homologue as described in Claim 1 which has a functional NAD⁺ binding domain and no zinc-finger sequence motif.

Group 2: Claims 2, 4 (appended to Claim 2 or 3), 7 (in full), Claims 3 (appended to Claim 2), 5, 6 8-32 (in part).

A PARP homologue as per Claim 1, characterized in that the functional NAD⁺ binding domain contains one of the sequence motifs described in Claim 2;

a PARP homologue as per Claim 2, comprising at least one other of the partial sequence motifs described in Claim 3; and

a PARP homologue as per Claim 2 or 3, selected from human PARP homologues characterized by an amino acid sequence as per SEQ ID NO: 2 (human PARP-2) or SEQ ID NO: 4 or 6 (human PARP-3 type 1 or 2); or murine PARP homologues characterized by the amino acid sequence as per SEQ ID NO: 8 (mouse PARP motif long form) or SEQ ID NO: 10 (mouse PARP short form); and nucleic acids as described in Claim 7, which code for said human and murine PARP homologues.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

Group 3: Claims 3 (appended to Claim 1), 5, 6, 8-32 (all in part).

A PARP homologue as per Claim 1 which in addition comprises at least the partial sequence motif LX₉NX₂YX₂QLLX(D/E)X_{10/11}WGRVG.

Group 4: Claims 3 (appended to Claim 1), 5, 6, 8-32 (all in part).

A PARP homologue as per Claim 1, which in addition comprises at least the partial sequence motif AX₃FXKX₄KTXNXWX₅FX₃PXK.

Group 5: Claims 3 (appended to Claim 1), 5, 6, 8-32 (all in part).

A PARP homologue as per Claim 1, which in addition comprises at least the partial sequence motif QXL(I/L)X₂IX₉MX₁₀PLGKLX₃QIX₆L.

Group 6: Claims 3 (appended to Claim 1), 5, 6, 8-32 (all in part).

A PARP homologue as per Claim 1, which in addition comprises at least the partial sequence motif FYTXIPHXFGX₃PP.

Group 7: Claims 3 (appended to Claim 1), 5, 6, 8-32 (all in part).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

A PARP homologue as per Claim 1, which in addition comprises at least the partial sequence motif KX₃LX₂LXDIEKAK₂L.

Each of the groups of inventions listed above also relates to other binding partners for the PARP homologues as described in Claim 5; the use of low-molecular PARP binding partners as per Claim 5 as described in Claims 31 and 32; nucleic acids as described in Claim 6 which code for the PARP homologues; nucleic acids which hybridize into said coding nucleic acids and nucleic acids derived therefrom; expression cassettes, recombinant vectors, recombinant microorganisms and transgenic mammals as described in Claims 8-11, which contain nucleic acids as per Claim 6; PARP-deficient mammals or PARP-deficient eukaryotic cells as described in Claim 12, wherein a functional expression of at least one gene coding for a PARP homologue as per one of Claims 1-4 is inhibited; *in vitro* detection methods for PARP inhibitors as described in Claims 13-22; *in vitro* screening methods for binding partners for a PARP molecule, as described in Claim 23; methods for the qualitative and quantitative assay of PARP homologues and nucleic acids coding for PARP homologues, as described in Claims 24-27; methods for determining the efficacy of PARP effectors, as described in Claim 28; a gene therapy agent as described in Claim 29; and a pharmaceutical agent as described in Claim 30.

The technical link between the above groups of inventions is expressed in the PARP homologue described in Claim 1. A PARP homologue as per Claim 1, however, is already

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

known from the prior art (cf. Box V, Novelty, 1.1):

D1 discloses the poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) of *Arabidopsis thaliana* (p. 104, Figure 1A; page 105, paragraph 3.2 and Figure 2). Said PARP has a functional NAD⁺ binding domain but no zinc-finger sequence motif. The PARP homologue described in Claim 1 is therefore not novel over the *Arabidopsis* PARP homologue disclosed in D1.

Consequently there exists no technical link between the above groups of inventions which is expressed in one or more identical or corresponding special technical feature(s), such that said groups of inventions are not linked by a single general inventive concept (*a posteriori* lack of unity).

When a further single examination fee has been paid, the examination will be restricted to the claims listed under Groups 1 and 2 (i.e. Claims 1, 2 and 4-32), as requested by the applicant in the letter of 7 July 2000.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Clarity, PCT Article 6

1. The terms "energy deficiency-mediated diseases" (Claim 27) and "clinical conditions mediated by energy deficiency" (Claim 32) have no meaning which is generally recognized in the field and therefore are not technical features by which the claimed subject matter can be defined clearly (PCT Rule 6.3(a)). The subject matter of said claims is therefore not clearly defined (PCT Article 6). As a rule the subject matter for which protection is sought should be defined by technical features in the claims (PCT Rule 6.2(a)).

2. Claim 27 does not state how the result of a method of detection described in the claims can be used for successful diagnosis. Since Claim 27 does not indicate these details, which are considered essential (PCT Rule 6.2(a)), said claim is unclear.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M139113-PCT



(1)

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 9/10, 15/54, C07K 14/455, C12N 15/10, C12Q 1/68, G01N 33/53, A61K 48/00, A01K 67/027, A61K 31/70, 38/45		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/64572
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03889		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Dezember 1999 (16.12.99).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 4. Juni 1999 (04.06.99)		(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Ludwigsplatz 4, D-67059 Ludwigshafen (DE).	
(30) Prioritätsdaten: 198 25 213.7 5. Juni 1998 (05.06.98) 199 08 837.3 1. März 1999 (01.03.99)		DE	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HR, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOCK, Michael [DE/DE]; Lillengasse 80, D-67105 Schifferstadt (DE). HÖGER, Thomas [DE/DE]; Rathenaustrasse 12, D-68535 Eden- gen-Neckarhausen (DE). KRÖGER, Burkhard [DE/DE]; Tilsiter Strasse 21, D-67117 Limburgerhof (DE). OTTERBACH, Bernd [DE/DE]; Rossinistrasse 11, D-67061 Ludwigshafen (DE). LUBISCH, Wilfried [DE/DE]; Häusererstrasse 15, D-69115 Heidelberg (DE). LEMAIRE, Hans-Georg [DE/DE]; Mainstrasse 8, D-67117 Limburg- erhof (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 8.Juni 2000 (08.06.00)	
(54) Title: POLY(ADP-RIBOSE)POLYMERASE GENE			
(54) Bezeichnung: POLY(ADP-RIBOSE)POLYMERASE-GENE			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) homologues which are characterised by an amino acid sequence with a) a functional NAD⁺-binding site and b) no zinc-finger-sequence motif of general formula CX₂CX_mHX₂C, wherein m is an integral number 28 or 30 and the radicals X represent any amino acid, independently of each other, and to the functional equivalents of said poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) homologues. The invention also relates to nucleic acids coding the poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) homologues, to antibodies with specificity for the novel protein, to pharmaceutical and gene therapy agents containing the inventive products, to methods for analytically determining the inventive proteins and nucleic acids, to methods for identifying the effectors or bonding partners of the inventive proteins, to novel PARP effectors and to methods for determining the effectiveness of effectors of this type.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)-Homologe, gekennzeichnet durch eine Aminosäuresequenz, welche a) eine funktionale NAD⁺-Bindungsdomäne und b) kein Zink-Finger-Sequenzmotiv der allgemeinen Formel: CX₂CX_mHX₂C, aufweist, worin m für einen ganzzahligen Wert von 28 oder 30 steht und die Reste X unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure stehen; und die funktionalen Äquivalente davon; dafür kodierende Nukleinsäuren; Antikörper mit Spezifität für die neuen Proteine; pharmazeutische und gentherapeutische Mittel, welche erfindungsgemäße Produkte enthalten; Verfahren zur analytischen Bestimmung der erfindungsgemäßen Proteine und Nukleinsäuren; Verfahren zur Identifizierung von Effektoren oder Bindungspartnern der erfindungsgemäßen Proteine; neuartige PARP-Effektoren; und Verfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit solcher Effektoren.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss der PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Neue Poly(ADP-ribose)polymerase-Gene

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) Gene und die von ihnen abgeleiteten Proteine; Antikörper mit Spezifität für die neuen Proteine; pharmazeutische und gentherapeutische Mittel, welche erfindungsgemäße Produkte enthalten; Verfahren zur analytischen Bestimmung der erfindungsgemäßen Proteine und Nukleinsäuren; Verfahren zur Identifizierung von Effektoren oder Bindungspartnern der erfindungsgemäßen Proteine; Verfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit solcher Effektoren sowie deren Anwendung zur Diagnose oder Therapie von Krankheitszuständen.

15

1966 entdeckten Chambon und Mitarbeiter ein 116 kD Enzym, das in den darauffolgenden Jahren näher charakterisiert wurde und heute die Namen PARP (EC 2.4.2.30) (Poly(adenosin-5'-diphospho-ribose) polymerase), PARS (Poly(adenosin-5'-diphospho-ribose) synthetase) oder ADPRT (Adenosin-5'-diphospho-ribose-transferase) trägt. Im Pflanzenreich (*Arabidopsis thaliana*) wurde 1995 ein 72 kD (637 Aminosäuren) PARP gefunden (Lepiniec, L. et al., FEBS Lett. 1995:364(2):103-8). Es war nicht klar, ob es sich bei dieser kürzeren Form von PARP um eine pflanzenspezifische Besonderheit oder ein Artefakt ("Splice"-Variante o. ä.) handelt. Bis dato war das 116 kD PARP-Enzym mit seiner infolge beschriebenen Aktivität im Tierreich und im Menschen einzigartig. Der Eindeutigkeit halber wird es im Folgenden mit PARP1 bezeichnet.

20

Die primäre, physiologische Funktion von PARP1 scheint in seiner Beteiligung an einem komplexen Reparaturmechanismus zu bestehen, den Zellen zur Reparatur von DNA-Strangbrüchen entwickelt haben. Die primäre zelluläre Reaktion auf einen DNA-Strangbruch scheint dabei in der PARP1-katalysierten Synthese von Poly(ADP-ribose) aus NAD⁺ zu bestehen (vgl. De Murcia, G. et al. (1994) TIBS, 19, 172).

PARP1 besitzt eine modular aufgebaute Molekülstruktur. Drei funktionale Hauptelemente wurden bisher identifiziert: eine N-terminale 46 kD große DNA-Bindungsdomäne; eine zentrale 22 kD Automodifikationsdomäne, an welche Poly(ADP-ribose) angehängt wird, wobei die Enzymaktivität von PARP1 mit zunehmender Elongation abnimmt; und eine C-terminale 54 kD große NAD⁺-Bindungsdomäne. Lediglich in PARP aus *Drosophila* wurde eine Leucin-Zipper-Region innerhalb der Automodifikationsdomäne festgestellt, welche auf

mögliche Protein-Protein-Interaktionen hinweist. Alle bisher bekannten PARPs sind vermutlich als Homodimere aktiv.

Der hohe Organisationsgrad des Moleküls spiegelt sich wider in 5 der starken Konservierung der Aminosäuresequenz. So wurde für PARP1 aus Mensch, Maus, Rind und Huhn eine 62%-ige Konservierung der Aminosäuresequenz festgestellt. Größere strukturelle Unterschiede bestehen zu PARP aus Drosophila. Die einzelnen Domänen selbst weisen wiederum Cluster mit erhöhter Konservierung auf. So 10 enthält die DNA-Bindungsregion zwei sogenannte Zink-Finger als Unterdomänen (umfassend Motive des Typs CX₂CX_{28/30}HX₂C), die an der Zn²⁺-abhängigen Erkennung von DNA-Einzelstrangbrüchen oder einzelsträngigen DNA-Überhängen (z.B. an den Chromosomenenden, den Telomeren) beteiligt sind. Die C-terminale katalytische Domäne um- 15 faßt einen Block von etwa 50 Aminosäuren (Reste 859-908), der unter Vertebraten zu etwa 100% konserviert ist (PARP- "Signature"). Dieser Block bindet das natürliche Substrat NAD⁺ und bedingt somit die Synthese von Poly(ADP-ribose) (vgl. de Murcia, a.a.O.). Insbesondere das GX₃GKG-Motiv ist für PARPs in diesem Block charakte- 20 ristisch.

Der oben beschriebenen positiven Funktion steht eine pathologische in zahlreichen Krankheiten (Schlaganfall, Herzinfarkt, Sepsis etc.) gegenüber. PARP ist in den Zelltod infolge von Ischämien des Gehirns (Choi, D.W., (1997) Nature Medicine, 3, 10, 25 1073), des Myokards (Zingarelli, B., et al (1997), Cardiovascular Research, 36, 205) und auch des Auges (Lam, T.T. (1997), Res. Comm. in Molecular Pathology and Pharmacology, 95, 3, 241) involviert. Auch bei septischem Schock wurde eine durch Entzündungs- 30 Mediatoren ausgelöste PARP-Aktivierung beobachtet (Szabo, C., et al. (1997), Journal of Clinical Investigation, 100, 3, 723). Dabei geht eine Aktivierung von PARP mit einem starken Verbrauch an NAD⁺ einher. Da für die Biosynthese von einem Mol NAD⁺ vier Mole ATP verbraucht werden, nimmt die zelluläre Energieversorgung drastisch ab. Zelltod ist die Folge. 35

Als PARP1-Inhibitoren werden in der oben genannten Fachliteratur Nicotinamid und 3-Aminobenzamid beschrieben. 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isochinolone ist aus Takahashi, K., et al (1997), Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 17, 1137 bekannt. Weitere Inhibitoren werden z.B. beschrieben in Banasik, M., et al. (1992) J. Biol. Chem., 267, 3, 1569 und Griffin, R.J., et al. (1995), Anti-Cancer Drug Design, 10, 507.

Als hochmolekulare Bindungspartner für humanes PARP1 ist unter anderem das Base Excision Repair (BER) Protein XRCC1 (X-ray repair cross-complementing 1) beschrieben worden, das über ein Zink-Finger-Motiv und ein BRCT (BRCA1 C-Terminus) Modul (Aminosäuren 372-524) bindet (Masson, M., et al., (1998) Molecular and Cellular Biology, 18,6, 3563).

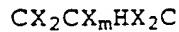
Aufgrund der vielfältigen physiologischen und pathologischen Funktionen von PARP stellte sich die Aufgabe, neue PARP-Homologe bereitzustellen. Die Bereitstellung von homologen PARP's wäre nämlich von besonderer Bedeutung für die Entwicklung neuer Wirkstofftargets bzw. neuer Wirkstoffe, um Diagnose und/oder Therapie von Krankheitszuständen zu verbessern, in welche PARP, PARP-Homologe oder davon abgeleitete Substanzen involviert sind.

15

Diese Aufgabe wurde überraschenderweise gelöst durch Bereitstellung von PARP-Homologen vorzugsweise aus menschlichen oder nichtmenschlichen Säugern, gekennzeichnet durch eine Aminosäuresequenz, die

20

- a) eine funktionale NAD⁺-Bindungsdomäne, d. h. eine PARP- "Signature"-Sequenz mit dem charakteristischen GX₃GKG-Motiv; und
- b) insbesondere im N-terminalen Sequenzbereich, d.h. im Bereich der ersten 200, wie z.B. im Bereich der ersten 100, N-terminalen Aminosäuren, keine PARP-Zink-Finger-Sequenzmotive der allgemeinen Formel



aufweist, worin

m für einen ganzzahligen Wert von 28 oder 30 steht und die Reste X unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure stehen;

und die funktionalen Äquivalente davon.

Da die erfindungsgemäßen PARP-Moleküle insbesondere funktionale Homologe darstellen, besitzen sie natürlich außerdem eine Poly-(ADP-ribose)-synthetisierende Aktivität. Die NAD-Bindungsdomäne entspricht im Wesentlichen dieser Aktivität und ist C-terminal lokalisiert.

Wesentliches Kennzeichen der erfindungsgemäßen PARPs ist somit das Vorhandensein einer funktionalen NAD⁺-Bindungsdomäne (PARP-Signatur), welche im C-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz (d.h. etwa im Bereich der letzten 400, wie z.B. der letzten 350 oder 300, C-terminalen Aminosäuren) liegt, in Kombination mit einer keiner Zink-Finger-Motive aufweisenden N-terminalen Sequenz. Da die Zink-Finger-Motive in bekannten PARPs vermutlich zur Erkennung der DNA-Bruchstellen beitragen, ist anzunehmen, daß die

erfindungsgemäßen Proteine mit DNA nicht oder in anderer Weise wechselwirken. Mit entsprechenden biochemischen Tests konnte nachgewiesen werden, daß das erfindungsgemäße PARP2 durch "aktivierte DNA" (d.h. limitiert DNaseI verdaute DNA) aktiviert werden kann. Daraus kann ferner geschlossen werden, daß das erfindungsgemäße PARP2 DNA bindende Eigenschaften hat. Der Mechanismus der DNA-Bindung und Enzym-Aktivierung bei den erfindungsgemäßen PARPs ist jedoch unterschiedlich zu dem von PARP1. Dessen DNA-Bindung und Enzym-Aktivierung wird wie erwähnt durch ein charakteristisches Zink-Finger-Motiv vermittelt. Derartige Motive sind in den erfindungsgemäßen PARPs nicht vorhanden. Vermutlich vermitteln positiv-geladene Aminosäuren im N-terminalen Bereich der erfindungsgemäßen PARPs diese Eigenschaften. Da die "aktivierte DNA" (d.h. zum Beispiel DNA, die limitiert mit DNaseI behandelt wurde) eine Vielzahl von Defekten aufweist (Einzelstrangbrüche, Einzelstranglücken, Einzelstrangüberhänge, Doppelstrangbrüche etc.) ist es möglich, daß PARP1 und die erfindungsgemäßen PARPs zwar durch dieselbe "aktivierte DNA" aktiviert werden, jedoch durch eine andere Subpopulation von Defekten (z. B. Einzelstranglücken statt Einzelstrangbrüche).

Die funktionale NAD⁺-Bindungsdomäne (d.h. katalytische Domäne) bindet das Substrat für die Synthese von Poly-(ADP-ribose). In Übereinstimmung mit bekannten PARPs ist insbesondere das Sequenzmotiv GX¹X²X³GKG, worin G für Glycin steht, K für Lysin steht und X¹, X² und X³ unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure stehen, zu finden. Wie jedoch ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der NAD⁺-Bindungsdomänen erfindungsgemäßer PARP-Moleküle mit bisher bekanntem humanem PARP1 überraschenderweise zeigt, weichen die erfindungsgemäßen Sequenzen von der bekannten Sequenz für die NAD⁺-Bindungsdomäne deutlich ab.

Einer erfindungsgemäß bevorzugten Gruppe von PARP-Molekülen ist folgendes allgemeines Sequenzmotiv in der katalytischen Domäne vorzugsweise gemeinsam:

PX_n(S/T)GX₃GKGIYFA (SEQ ID NO:11), insbesondere
(S/T)XGLR(I/V)XPX_n(S/T)GX₃GKGIYFA (SEQ ID NO:12),
vorzugsweise
40 LLWHG(S/T)X₇IL(S/T)XGLR(I/V)XPX_n(S/T)GX₃GKGIYFAX₃SKSAXY
(SEQ ID NO:13)

worin (S/T) die alternative Besetzung dieser Sequenzposition mit S oder T beschreibt, (I/V) die alternative Besetzung dieser Sequenzposition mit I oder V beschreibt und n für einen ganzzahligen Wert von 1 bis 5 steht und die Reste X unabhängig voneinan-

der für eine beliebige Aminosäure stehen. Letztes Motiv wird auch als "PARP-Signature" Motiv bezeichnet.

Die Automodifikationsdomäne ist in den erfindungsgemäßen PARPs 5 vorzugsweise ebenfalls ausgebildet. Sie kann im Bereich von etwa 100 bis 200 Aminosäuren vor dem N-terminalen Ende der NAD⁺-Bindungsdomäne liegen.

Erfindungsgemäße PARP-Homologe können außerdem N-terminal zur 10 NAD⁺-Bindungsdomäne (d.h. etwa 30 bis etwa 80 Aminosäuren näher am N-Terminus) ein Leucin-Zipper-artiges Sequenzmotiv der allgemeinen Formel

(L/V)X₆LX₆LX₆L (SEQ ID NO:14)

15 umfassen,

worin (L/V) für die alternative Besetzung dieser Sequenzposition mit L oder V steht und die Reste X unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure stehen. Die erfindungsgemäß beobachteten Leucin-Zipper-Motive unterscheiden sich hinsichtlich ihrer 20 Lage deutlich von den für PARP aus *Drosophila* beschriebenen. Leucin-Zipper können zu Homodimeren (zwei PARP-Moleküle) oder Heterodimeren (ein PARP-Molekül mit einem davon verschiedenen Bindungspartner) führen.

25 Die erfindungsgemäßen PARP-Homologen umfassen vorzugsweise außerdem N-terminal zum oben genannten Leucin-Zipper-artigen Sequenzmotiv, d.h. etwa 10 bis 250 Aminosäurereste näher am N-Terminus, wenigstens ein weiteres der folgenden Teilsequenz-Motive:

30 LX₉NX₂YX₂QLLX(D/E)X_bWGRVG, (Motiv 1; SEQ ID NO:15)
 AX₃FXKX₄KTXNXWX₅FX₃PXK, (Motiv 2; SEQ ID NO:16)
 QXL(I/L)X₂IX₉MX₁₀PLGKLX₃QIX₆L, (Motiv 3; SEQ ID NO:17)
 FYTXIPHXFGX₃PP, (Motiv 4; SEQ ID NO:18)
 und
35 KX₃LX₂LXDIEXAX₂L (Motiv 5; SEQ ID NO:19),

worin (D/E) die alternative Besetzung dieser Sequenzposition mit D oder E beschreibt, (I/L) die alternative Besetzung dieser Sequenzposition mit I oder L beschreibt, b für den ganzzahligen 40 Wert 10 oder 11 steht und die Reste X unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure stehen. Am meisten bevorzugt sind diese Motive 1 bis 5 in der genannten Reihenfolge gleichzeitig vorhanden, wobei Motiv 1 dem N-Terminus am nächsten liegt.

45 Auf das oben genannte PARP-Signature Motiv folgt in den erfindungsgemäßen Proteinen wenigstens ein weiteres der folgenden Motive:

GX₃LXEVALG (Motiv 6; SEQ ID NO:20)
 GX₂SX₄GX₃PX_aLXGX₂V (Motiv 7; SEQ ID NO:21) und
 E(Y/F)X₂YX₃QX₄YLL (Motiv 8; SEQ ID NO:22)

5

worin (Y/F) die alternative Besetzung dieser Sequenzposition mit Y oder F beschreibt, a gleich 7 bis 9 und X jeweils für eine beliebige Aminosäure steht. Am bevorzugtesten sind die drei C-terminalen Motive gleichzeitig und in der genannten Reihenfolge ausgebildet, wobei Motiv 8 dem C-Terminus am nächsten liegt.

Ein bevorzugter Aufbau einer erfindungsgemäßen PARP-Struktur kann schematisch wie folgt beschrieben werden:

15 Motive 1 bis 5/PARP-Signature/Motive 6 bis 8 oder
 Motive 1 bis 5/Leucin-Zipper/PARP-Signature/Motive 6 bis 8

wobei zwischen den Einzelmotiven weiterer Aminosäurerreste, wie z.B. bis zu 40, und am N-Terminus und/oder am C-Terminus weitere 20 Aminosäurerreste, wie z.B. bis zu 80, angeordnet sein können.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugte PARP-Homologe sind die Proteine humanPARP2, humanPARP3, mausPARP3 und die funktionalen Äquivalente davon. Das als humanPARP2 bezeichnete Protein umfaßt 25 570 Aminosäuren (vgl. SEQ ID NO:2). Das als humanPARP3 bezeichnete Protein existiert möglicherweise in zwei Formen. Typ 1 umfaßt dabei 533 Aminosäuren (SEQ ID NO:4) und Typ 2 umfaßt 540 Aminosäuren (SEQ ID NO:6). Die Formen können sich durch unterschiedliche Initiation der Translation ergeben. Das als mausPARP3 30 bezeichnete Protein existiert in zwei Formen, die sich durch eine Deletion von 5 Aminosäuren (15 bp) voneinander unterscheiden. Typ 1 umfaßt dabei 533 Aminosäuren (SEQ ID NO:8), Typ 2 umfaßt 528 Aminosäuren (SEQ ID NO:10). Die erfindungsgemäßen PARP-Homologen unterscheiden sich in ihren Sequenzen deutlich von dem aus Arabidopsis thaliana (a.a.O.) bekannten PARP-Protein. So weisen PARP2 35 und PARP3 z. B. nicht die Pflanzen-PARP charakteristische Peptidsequenz AAVLDQWIPD, entsprechend den Aminosäureresten 143 bis 152 des Arabidopsis-Proteins, auf.

40 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Bindungspartner für die erfindungsgemäßen PARP-Homologen. Diese Bindungspartner sind vorzugsweise ausgewählt unter

- a) Antikörpern und Fragmenten, wie z.B. Fv, Fab, F(ab)'₂, davon
- b) proteinartigen Verbindungen, welche, z.B. über die obige Leucin-Zipper-Region oder einen anderen Sequenzabschnitt, mit PARP wechselwirken, und

c) niedermolekularen Effektoren, welche eine biologische PARP-Funktion, wie z.B die katalytische PARP-Aktivität, d.h. die NAD⁺-verbrauchende ADP-Ribosylierung, oder die Bindung an ein Aktivatorprotein oder an DNA modulieren.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Nukleinsäuren, umfassend

- a) eine, für wenigstens ein erfindungsgemäßes PARP-Homologes kodierende, Nukleotidsequenz oder die komplementäre Nukleotidsequenz davon;
- b) eine Nukleotidsequenz, die, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen mit einer Sequenz gemäß a) hybridisiert; oder
- c) Nukleotidsequenzen, die durch Entartung (Degeneration) des genetischen Codes von den in a) und b) definierten Nukleotidsequenzen abgeleitet sind.

Insbesondere umfassen erfindungsgemäß geeignete Nukleinsäuren wenigstens eine der Teilsequenzen welche für die oben genannten Aminosäuresequenzmotive kodieren.

20

Erfindungsgemäß bevorzugte Nukleinsäuren umfassen Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 und 3, und insbesondere für erfindungsgemäß PARP-Homologe charakteristische Teilsequenzen daraus, wie z.B. Nukleotidsequenzen, umfassend

25

- a) die Nukleotide +3 bis + 1715 gemäß SEQ ID NO:1;
- b) die Nukleotide +242 bis + 1843 gemäß SEQ ID NO:3;
- c) die Nukleotide +221 bis + 1843 gemäß SEQ ID NO:5;
- d) die Nukleotide +112 bis +1710 gemäß SEQ ID NO:7; oder
- e) die Nukleotide + 1 bis + 1584 gemäß SEQ ID NO:9

oder Teilsequenzen von a), b), c), d) und e), welche für oben genannte charakteristische Aminosäuresequenzmotive der erfindungsgemäß PARP-Homologen kodieren.

35

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung umfaßt Expressionskassetten, welche unter genetischer Kontrolle regulativer Nukleotidsequenzen wenigstens eine der oben beschriebenen erfindungsgemäßigen Nukleotidsequenzen enthalten. Diese sind zur Herstellung erfindungsgemäßer rekombinanter Vektoren, wie z.B. von viralen Vektoren oder Plasmiden brauchbar, welche wenigstens eine erfindungsgemäß Expressionskassette enthalten.

Erfindungsgemäß rekombinante Mikroorganismen sind mit wenigstens einem der oben genannten Vektoren transformiert.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Säuger, transfiziert mit einem erfindungsgemäßen Vektor.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein, homogen oder 5 heterogen durchführbares, in vitro Nachweisverfahren für PARP-Inhibitoren, das dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) ein ungeträgertes oder geträgertes Poly-ADP-ribosylierbares Target mit einem Reaktionsgemisch inkubiert, umfassend
 - 10 a1) ein erfindungsgemäßes PARP-Homologes;
 - a2) einen PARP-Aktivator; und
 - a3) einen PARP-Inhibitor oder einen Analyten, in welchem man wenigstens einen PARP-Inhibitor vermutet;
- b) die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durchführt; und
- 15 c) die Poly-ADP-Ribosylierung des Target qualitativ oder quantitativ bestimmt.

Vorzugsweise wird das Nachweisverfahren so durch geführt, dass man das PARP-Homologe mit dem PARP-Aktivator und dem PARP-Inhibitor oder einen Analyten, in welchem man wenigstens einen PARP-Inhibitor vermutet, vorinkubiert, wie z.B. etwa 1 bis 30 Minuten, bevor man die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durchführt.

Nach Aktivierung durch DNS mit Einzelstrangbrüchen (erfindungsgemäß bezeichnet als "aktivierte DNS") poly-ADP-ribosyliert PARP eine Vielzahl nukleärer Proteine in Gegenwart von NAD. Zu diesen Proteinen zählt zum einen PARP selber, aber auch Histone etc.

Das bei den Nachweisverfahren vorzugsweise verwendete Poly-ADP-ribosylierbare Target ist ein Histon-Protein in seiner nativen Form oder ein davon abgeleitetes Poly-ADP-ribosylierbares Äquivalent. Beispielhaft wurde eine Histonpräparation der Firma Sigma verwendet (SIGMA, Katalog-Nr. H-7755; Histone Typ II-AS aus Kalbstthymus, Luck, J. M., et al., J. Biol. Chem., 233, 1407 35 (1958), Satake K., et al., J. Biol. Chem., 235, 2801 (1960)). Im Prinzip können alle Arten von Proteinen oder Teile von diesen verwendet werden, die einer Poly-ADP-ribosylierung durch PARP zugänglich sind. Dies sind bevorzugterweise nukläre Proteine, z. B. Histone, DNA-Polymerase, Telomerase oder PARP selber. Auch 40 synthetische Peptide, die von den entsprechenden Proteinen abgeleitet sind, können als Target fungieren.

Es können im erfindungsgemäßen ELISA Histonmengen im Bereich von etwa 0,1 µg/well bis etwa 100 µg/well, vorzugsweise etwa 1 µg/well 45 bis etwa 10 µg/well, verwendet werden. Die PARP-Enzymmengen liegen in einem Bereich von etwa 0,2 pMol/well bis etwa 2 nMol/well, vorzugsweise von etwa 2 pMol/well bis etwa 200 pMol/well, wobei

der Reaktionsansatz jeweils 100 µl/well ausmacht. Reduzierungen auf kleinere Wells und entsprechend kleinere Reaktionsvolumina sind möglich.

5 Beim erfindungsgemäßen HTRF Assay werden identische PARP-Mengen eingesetzt, die Menge an Histon oder modifizierten Histonen liegt im Bereich von etwa 2 ng/well bis etwa 25 µg/well, vorzugsweise etwa 25 ng/well bis etwa 2,5 µg/well, wobei der Reaktionsansatz jeweils 50 µl/well ausmacht. Reduzierungen auf kleinere Wells und 10 entsprechend kleinere Reaktionsvolumina sind möglich.

Der erfindungsgemäß verwendete PARP-Aktivator ist vorzugsweise aktivierte DNA.

15 Als Aktivator können diverse Typen geschädigter DNA fungieren. DNA-Schädigungen können durch Verdau mit DNasen oder anderen DNA-modifizierenden Enzymen (z. B. Restriktionsendonukleasen), durch Bestrahlung oder andere physikalische Methoden oder chemische Behandlung der DNA erzielt werden. Ferner ist es möglich, mittels 20 synthetischer Oligonukleotide die Situation einer DNA-Schädigung gezielt zu simulieren. In den beispielhaft angegebenen Assays wurde aktivierte DNA aus Kalbstthymus eingesetzt (SIGMA, Produkt-Nr. D4522, CAS: 91080-16-9, hergestellt nach der Methode von Aposhian und Kornberg unter Verwendung von Kalbstthymus-DNA (SIGMA 25 D-1501) und Deoxyribonuklease Typ I (D-4263). Aposhian H. V. und Kornberg A., J. Biol. Chem., 237, 519 (1962)). Verwendet wurde die aktivierte DNA in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1000 µg/ml, vorzugsweise von 1 bis 100 µg/ml im Reaktionsschritt.

30 Die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion wird in den erfindungsgemäßen Verfahren durch Zugabe von NAD⁺ gestartet. Die Konzentrationen von NAD lagen in einem Bereich von etwa 0,1 µM bis etwa 10 mM, bevorzugt in einem Bereich von etwa 10 µM bis etwa 1 mM.

35 Gemäß der heterogen durchführbaren Variante obigen Verfahrens wird die Poly-ADP-Ribosylierung des geträgererten Target mit Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper bestimmt. Dazu trennt man das Reaktionsgemisch vom geträgererten Target ab, wäscht und inkubiert mit dem Antikörper. Dieser Antikörper kann selbst markiert sein. Alternativ 40 verwendet man zum Nachweis von gebundenem Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper einen markierten sekundären Antikörper, oder ein entsprechendes markiertes Antikörperfragment. Geeignete Markierungen sind z.B. Radiomarkierung, Chromophor- oder Fluorophormarkierung, Biotinylierung, Chemilumineszenzmarkierung, Markierung mit paramagnetischem Metall, oder insbesondere Enzymmar- 45

kierungen, wie z.B. mit Meerrettich-Peroxidase. Entsprechende Nachweistechniken sind dem Fachmann allgemein bekannt.

Gemäß der homogen durchführbaren Variante obigen Verfahrens ist 5 das nichtgeträgerete Target mit einem Akzeptor-Fluorophor markiert. Bevorzugt verwendet man dazu als Target biotinyliertes Histon, wobei das Akzeptor-Fluorophor über Avidin oder Streptavidin an die Biotingruppen des Histons gekoppelt ist. Als Akzeptor-Fluorophor sind insbesondere geeignet Phycobiliproteine (z. B. 10 Phycocyanine, Phycoerythrine), z. B. R-Phycocyanin (R-PC), Allo-phycocyanin (APC), R-Phycoerythrin (R-PE), C-Phycocyanin (C-PC), B-Phycoerythrin (B-PE) oder ihre Kombinationen untereinander oder mit Fluoreszenzfarbstoffen, wie Cy5, Cy7 oder Texas Red (Tandem system) (Thammapalerd, N. et al., Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health, 27(2): 297-303 (1996); Kronick, M. N. et al., Clinical Chemistry, 29(9), 1582-1586 (1986); Hicks, J. M., Human Pathology, 15(2), 112-116 (1984)). Bei dem in den Beispielen verwendeten Farbstoff XL665 handelt es sich um ein quervernetztes Allophycocyanin (Glazer, A. N., Rev. Microbiol., 15 20 36, 173-198 (1982); Kronick, M. N., J. Imm. Meth., 92, 1-13 (1986); MacColl, R. et al., Phycobiliproteins, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1987); MacColl, R. et al., Arch. Biochem. Biophys., 208(1), 42-48 (1981)).

25 Außerdem ist bevorzugt, bei dem homogenen Verfahren die Poly-ADP-Ribosylierung des nicht geträgereten Target mit Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper zu bestimmen, der mit einem Donor-Fluorophor markiert ist, das zur Energieübertragung auf das Akzeptor-Fluorophor befähigt ist, wenn Donor und Akzeptor durch Bindung des markierten Antikörpers an das Poly-ADP-ribosyierte Histon in räumliche Nähe gelangen. Vorzugsweise verwendete man ein ein Europium-Kryptat als Donor-Fluorophor für den Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper.

35 Neben dem verwendeten Europium-Kryptat können auch weitere Verbindungen als potentielle Donor-Moleküle auftreten. Hierbei kann zum einen der Kryptatkäfig modifiziert werden. Auch Austausch des Europiums gegen andere Seltenerdmetalle, wie z. B. Terbium, ist denkbar. Entscheidend ist eine lange Lebensdauer der Fluoreszenz, 40 die die Zeitverzögerung garantiert (Lopez, E. et al., Clin. Chem. 39/2, 196-201 (1993); US-Patent 5,534,622).

Die oben beschriebenen Nachweisverfahren basieren auf dem Prinzip, daß die Aktivität von PARP mit der Menge der an den Histonen 45 gebildeten ADP-ribose-Polymeren korreliert. Der hier beschriebene Assay ermöglicht die Quantifizierung der ADP-ribose Polymere mittels spezifischer Antikörper in Form eines ELISA- und eines HTRF-

(homogenous time-resolved fluorescence; homogene zeit-aufgelöste Fluoreszenz) Assays. Konkrete Ausführungsformen dieser beiden Tests sind in den folgenden Ausführungsbeispielen näher beschrieben.

5

Das entwickelte HTRF (Homogenous Time-Resolved Fluorescence)-Testsystem mißt die Bildung von Poly-(ADP-Ribose) an Histonen mittels spezifischer Antikörper. Im Unterschied zum ELISA wird dieser Test in homogener Phase ohne Separations- und Wasch-10 schritte durchgeführt. Dies ermöglicht einen höheren Probendurchsatz und eine geringere Fehleranfälligkeit. HTRF basiert auf dem "Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer" (FRET) zwischen zwei Fluorophoren. In einem FRET Assay kann ein angeregtes Donor-Fluorophor seine Energie auf ein Akzeptor-Fluorophor übertragen, wenn15 sich die beiden in einer räumlichen Nähe befinden. In der HTRF-Technologie ist das Donor-Fluorophor ein Europium-Kryptat [(Eu)K] und der Akzeptor ist XL665, ein stabilisiertes Allophycocyanin. Das Europium-Kryptat basiert auf Arbeiten von Jean Marie Lehn (Strasbourg) (Lopez, E. et al., Clin. Chem. 39/2, 196-201 (1993);20 US-Patent 5,534,622).

In einem homogenen Assay sind alle Komponenten auch während der Messung anwesend. Während dies Vorteile bei der Assaydurchführung bringt (Schnelligkeit, Aufwand), müssen Störungen durch Assaykomponenten (Eigenfluoreszenz, Quenching durch Farbstoffe etc.) ausgeschlossen werden. HTRF schließt diese Störungen durch eine zeitverzögerte Messung bei zwei Wellenlängen (665nm, 620nm) aus. Die HTRF hat eine sehr lange Abklingzeit und kann daher zeitverzögert gemessen werden. Jegliche interferierende, kurzlebige Hintergrundfluoreszenz (z. B. durch Assaykomponenten oder Inhibitoren der Substanzbank) stört hier nicht mehr. Darüberhinaus wird permanent bei zwei Wellenlängen gemessen, um "Quench-Effekte" farbiger Substanzen zu kompensieren. HTRF Assays sind z.B. im 96- oder 384-well Mikrotiterplattenformat realisierbar und werden mit35 einem "Discovery HTRF Microplate Analyzer" (Canberra Packard) ausgewertet.

Erfnungsgemäß werden außerdem die folgenden in vitro-Screeningverfahren auf Bindungspartner für PARP, insbesondere für ein erf-40 findungsgemäßes PARP-Homologes, bereitgestellt.

Eine erste Variante wird so durchgeführt, daß man
al) wenigstens ein PARP-Homologes an einem Träger immobilisiert;
bl) das immobilisierte PARP-Homologe mit einem Analyten in Kon-
45 takt bringt, in welchem man wenigstens einen Bindungspartner
vermutet; und

c1) an das immobilisierte PARP-Homologe gebundene Bestandteile des Analyten, gegebenenfalls nach einer Inkubationsphase, bestimmt.

5 Gemäß einer zweiten Variante wird

a2) ein Analyt, welcher wenigstens einen möglichen Bindungspartner für das PARP-Homologe enthält, an einem Träger immobilisiert;

10 b2) der immobilisierte Analyt mit wenigstens einem PARP-Homologen in Kontakt gebracht, für welches man einen Bindungspartner sucht; und

c3) der immobilisierte Analyt wird, gegebenenfalls nach einer Inkubationsphase, auf die Bindung des PARP-Homologen untersucht.

15

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung einer PARP-Homologe kodierenden Nukleinsäure, gekennzeichnet durch

a) Inkubation einer biologischen Probe mit einer definierten 20 Menge einer exogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäure (z.B. mit einer Länge von etwa 20 bis 500 Basen oder länger), Hybridisierung, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, Bestimmung der hybridisierenden Nukleinsäuren und gegebenenfalls Vergleich mit einem Standard; oder

25

b) Inkubation einer biologischen Probe mit einer definierten Menge von Oligonucleotid-Primerpaaren mit Spezifität für ein PARP-Homologes kodierende Nukleinsäure, Amplifizierung der Nukleinsäure, Bestimmung des Amplifikationsprodukts und gegebenenfalls Vergleich mit einem Standard.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung eines erfindungsgemäßen PARP-Homologen, gekennzeichnet durch

35 a) Inkubation einer biologischen Probe mit wenigstens einem für ein PARP-Homologes spezifischen Bindungspartner,
b) Nachweis des Bindungspartner/PARP-Komplexes und gegebenenfalls
c) Vergleich des Ergebnisses mit einem Standard.

40

Vorzugsweise ist hierbei der Bindungspartner ein Anti-PARP-Antikörper oder ein bindendes Fragment davon, der gegebenenfalls eine detektierbare Markierung trägt.

45 Die erfindungsgemäßen Bestimmungsverfahren für PARP, insbesondere für PARP-Homologe und für die kodierenden Nukleinsäuresequenzen davon eignen sich vorteilhaftweise zur Diagnostizierung von

Sepsis- oder Ischämie-bedingten Gewebeschädigungen, insbesondere von Schlaganfällen, Myokard-Infarkten, Diabetes oder septischen Schocks.

5 Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit vom PARP-Effektoren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) ein erfindungsgemäßes PARP-Homologes mit einem Analyten inkubiert, welcher einen Effektor einer physiologischen oder pathologischen PARP-Aktivität enthält; den Effektor gegebenenfalls wieder abtrennt; und
- 10 b) die Aktivität des PARP-Homologen, gegebenenfalls nach Zugabe von Substraten oder Cosubstraten, bestimmt.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft gentherapeutisches Mittel, die in einem gentherapeutisch akzeptablen Träger ein Nukleinsäurekonstrukt enthalten, das

- a) eine Antisense-Nukleinsäure gegen eine kodierende Nukleinsäure gemäß der Erfindung; oder
- 20 b) ein Ribozym gegen eine nicht-kodierende erfindungsgemäß Nukleinsäure umfasst; oder
- c) für einen spezifischen PARP-Inhibitor kodiert.

25 Weiterhin betrifft die Erfindung pharmazeutische Mittel, enthaltend in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger wenigstens ein erfindungsgemäßes PARP-Protein, wenigstens einen erfindungsgemäß PARP-Bindungspartner oder wenigstens eine erfindungsgemäß kodierende Nukleotidsequenz.

30 Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung von Bindungspartnern eines PARP-Homologen zur Diagnose oder Therapie von Krankheitszuständen, an deren Entstehung und/oder Verlauf wenigstens ein PARP-Protein, insbesondere ein erfindungsgemäßes PARP-Homologes, oder ein davon abgeleitetes Polypeptid beteiligt ist. Der verwendete Bindungspartner kann beispielsweise ein niedermolekularer Bindungspartner sein, dessen Molekulargewicht z. B. kleiner als etwa 2000 Dalton oder kleiner als etwa 1000 Dalton sein kann.

40 Gegenstand der Erfindung ist außerdem die Verwendung von PARP-Bindungspartnern zur Diagnose oder Therapie von Krankheitszuständen, die durch eine Energiedefizienz vermittelt werden. Eine Energiedefizienz im Sinne vorliegender Erfindung ist insbesondere eine zelluläre Energiedefizienz, welche bei dem erkrankten Patienten systemisch oder in einzelnen Körperteilen, Organen oder Organbereichen, oder Geweben oder Gewebebereichen zu beobachten

ist. Diese ist durch eine über den physiologischen Schwankungsbe-
reich des NAD- und/oder ATP-Spiegels nach oben oder unter hinaus-
gehende NAD- und/oder ATP-Depletion gekennzeichnet, welche vor-
zugsweise durch ein Protein mit PARP-Aktivität, insbesondere ein
erfindungsgemäßes PARP-Homologes, oder ein davon abgeleitetes Po-
lypeptid, vermittelt wird.

"Ernergiedefizienz vermittelte Erkrankungen" im Sinne der Erfin-
dung umfassen ferner solche bei denen eine Gewebeschädigung auf
Zelltod infolge von Nekrose oder Apoptose zurückzuführen ist.
Die erfindungsgemäßigen Methoden sind geeignet zur Behandlung und
Vorbeugung von Gewebeschädigungen infolge einer Zellschädigung
durch Apoptose oder Nekrose; Schädigungen des Nervengewebes durch
Ischämien und/oder Reperfusion; neurologischen Erkrankungen; neu-
rodegenerativen Erkrankungen; vaskulärem Schlaganfall; zur Behand-
lung und Vorbeugung kardiovaskulärer Erkrankungen; zur Behandlung
anderer Erkrankungen oder Zustände, wie zum Beispiel altersbe-
dingter Makuladegeneration, AIDS oder anderen Immunschwächeer-
krankungen; Arthritis; Atherosklerosis; Kachexie; Krebs; degene-
rativen Erkrankungen der Skelettmuskulatur; Diabetes; Schädel-
trauma; entzündlichen Erkrankungen des Magen/Darmtraktes, wie zum
Beispiel Crohnsche Erkrankung; Muskeldystrophie; Osteoarthritis;
Osteoporose; chronischen und/oder akuten Schmerzen; Nierenversa-
gen; Retinaischämie; septischem Schock (wie zum Beispiel Endoto-
xin-Schock); Alterung der Haut oder Alterung allgemein; allge-
meine Alterungerscheinungen. Die erfindungsgemäßigen Methoden sind
außerdem einsetzbar zur Verlängerung der Lebenszeit und der pro-
liferativen Kapazität von Körperzellen und zur Sensitisierung von
Tumorzellen bei einer Bestrahlungstherapie.

Gegenstand der Erfindung ist insbesondere die Verwendung eines
PARP-Bindungspartners gemäß obiger Definition zur Diagnose oder
Therapie (akut oder prophylaktisch) von Energiedefizienz-vermit-
telten Krankheitszuständen, ausgewählt unter neurodegenerativen
Erkrankungen, oder Sepsis- oder Ischämie-bedingten Gewebeschädi-
gungen, insbesondere von neurotoxischen Störungen, Schlaganfällen,
Myokard-Infarkten, Schädigungen während oder nach der In-
farktlyse (z. B. mit TPA, Reteplase oder mechanisch mit Laser
oder Rotablator) und von Mikroinfarkten während und nach Herz-
klappenersatz, Aneurismenresektionen und Herztransplantationen,
Kopf- und Rückenmarkstraumen, Infarkten der Niere (akutes Nieren-
versagen, akute Niereninsuffizienz oder Schädigungen während und
nach einer Nierentransplantation), Infarkten der Leber (Leberversa-
gen, Schädigungen während oder nach einer Lebertransplanta-
tion), Schädigungen der Skelettmuskulatur, peripheren Neuropa-
thien, AIDS Demenz, septischen Schocks, Diabetes, neurodegenera-
tiven Erkrankungen, die nach Ischämie, Trauma (Schädel-Hirn-

Trauma), Massenblutung, Subarachnoidal-Blutungen und Schlaganfall auftreten, sowie neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer-krankheit, multipler Infarkt-Dementia, Huntington-Erkrankung, Parkinsonscher Krankheit, amyotropher lateraler Sklerose, Epilepsie, insbesondere von generalisierten epileptischen Anfällen, wie z. B. Petit mal, und tonisch-clonischen Anfällen und partiell epileptischen Anfällen, wie Temporal Lobe, und komplex-partiellen Anfällen, Nierenversagen, darüber hinaus bei der Chemotherapie von Tumoren und Verhinderung von Metastasierung sowie zur Behandlung von Entzündungen und rheumatischen Erkrankungen, z. B. der rheumatischen Arthritis; ferner bei der Behandlung einer Revaskularisation kritisch verengter Koronararterien und kritisch verengter peripherer Arterien, z. B. Beinarterien.

15 "Ischämie" im Sinne der Erfindung umfaßt eine lokalisierte Sauerstoffunterversorgung eines Gewebes, bedingt durch Blockierung des arteriellen Blutflusses. Globale Ischämie tritt auf, wenn der Blutfluß zum gesamten Gehirn für eine limitierte Zeit unterbrochen wird. Dies kann z.B. durch Herzstillstand bedingt sein.

20 Fokale Ischämie tritt auf, wenn ein Teil des Gehirns von seiner normalen Blutzufuhr abgeschnitten wird. Fokale Ischämie kann durch thromboembolischen Verschluß eines Blutgefäßes, durch Hirntrauma, Ödeme oder Hirntumor verursacht werden. Selbst vorübergehende Ischämien können zu weitreichenden neuronalen Schäden führen. Auch wenn Schäden an "Nervengewebe" Tage oder Wochen nach dem Beginn der Ischämie auftreten können, treten manche permanente Schäden (z.B. nekrotischer Zelltod) in den ersten Minuten nach dem Unterbrechen der Blutzufuhr auf. Diese Schäden sind zum Beispiel bedingt durch Glutamat-Neurotoxizität und folgen einer 25 sekundären Reperfusion, wie z.B. Freisetzung von Radikalen (z.B. Sauerstoff-Radikalen, NO-Radikalen). Ischämien können ebenso in anderen Organen und Geweben wie zum Beispiel im Herzen (Herzinfarkt und anderen kardiovaskulären Erkrankungen bedingt durch Verschluß der Koronararterien) oder im Auge (Ischämie der Retina) 30 auftreten.

Gegenstand der Erfindung ist außerdem die Verwendung einer effektiven therapeutischen Menge eines PARP-Bindungspartners zur Beeinflussung neuronaler Aktivität. "Neuronale Aktivität" im Sinne 40 der Erfindung kann in einer Stimulation geschädigter Neuronen, Förderung der neuronalen Regeneration oder Behandlung von neuronalen Erkrankungszuständen bestehen.

"Neuronale Schäden" im Sinne der Erfindung umfassen jede Art von 45 Schädigung des "Nervengewebes" und jede körperliche oder geistige Beeinträchtigung oder Tod infolge dieser Schädigung. Die Ursache der Schädigung kann zum Beispiel metabolischer, toxischer, chemi-

scher, thermischer Art sein und schließt beispielhaft Ischämien, Hypoxien, Trauma, cerebrovaskuläre Schäden, Operationen, Druck, Hemorrhagien, Bestrahlungen, Vasospasmen, neurodegenerative Erkrankungen, Infektionen, Epilepsie, Wahrnehmungsstörungen, Störungen im Glutamatstoffwechsel und die durch sie bedingten sekundären Effekte ein.

"Nervengewebe" im Sinne der Erfindung umfaßt die verschiedenen Komponenten, die das Nervensystem bilden, ausgewählt unter anderem aus Neuronen, Glia-Zellen, Astrozyten, Schwannschen Zellen, dem Gefäßsystem innerhalb und zur Versorgung, dem ZNS, Gehirn, Stammhirn, Rückenmark, peripheres Nervensystem etc.

"Neuroprotektiv" im Sinne der Erfindung umfaßt die Reduktion, den Stop, die Verlangsamung oder die Verbesserung neuronalen Schäden und den Schutz, die Wiederbelebung, die Regeneration von Nervengewebe, das einem neuronalen Schaden ausgesetzt war.

Eine "Prävention von neurodegenerativen Erkrankungen" schließt die Möglichkeit zur Verhinderung, Verlangsamung und Verbesserung von neurodegenerativen Erkrankungen bei Personen ein, bei denen eine solche Erkrankung diagnostiziert wurde oder die zu entsprechenden Risikogruppen für diese neurodegenerativen Erkrankungen zählen. Ebenso ist die Behandlungen von Personen gemeint, die bereits an Symptomen dieser Erkrankungen leiden.

"Behandlung" im Sinne der Erfindung umfaßt

- (i) Verhinderung einer Erkrankung, einer Störung oder eines Zustandes in Personen mit einer Prädisposition zu diesen;
- 30 (ii) Verhinderung einer Erkrankung, einer Störung oder eines Zustandes durch Verlangsamung ihres Fortschritts; und
- 35 (iii) Verbesserung einer Erkrankung, einer Störung oder eines Zustandes.

Bespiele für "neurologische Erkrankungen", die durch die erfundungsgemäßen Methoden behandelt werden können, sind Neuralgien (trigeminal, glossopharyngeal), Myasthenia gravis, Muskeldystrophien, Amyotrophe Laterale Sklerose (ALS), progressive Muskelatrophie, periphere Neuropathien bedingt durch Vergiftungen (z.B. Bleivergiftung), Guillain-Barré-Syndrom, Huntington-Krankheit, Alzheimerse Kranheit, Parkinsonsche Kranheit, oder Plexus-Erkrankungen. Bevorzugt sind die erfundungsgemäßen Methoden geeignet zur Behandlung von neurologischen Erkrankungen, ausgewählt unter peripheren Neuropathien, bedingt durch physische Verletzung

oder Erkrankung; Schädeltrauma, wie zum Beispiel traumatische Hirnverletzung; physische Schädigung des Rückenmarks; Schlaganfall einhergehend mit Hirnschädigung, wie vaskulärer Schlaganfall in Verbindung mit Hypoxie und Hirnschädigung, und cerebrale Re- 5 perfusionschäden; demyelinierenden Erkrankungen (Myelopathien, Alzheimersche Erkrankung, Parkisonsche Erkrankung, Huntington- Krankheit, Amyotrophe Laterale Sklerose).

Die erfindungsgemäßen Methoden können ferner zur Behandlung kar- 10 dioaskulärer Erkrankungen verwendet werden. "Kardiovaskuläre Er- krankungen" im Sinne der Erfahrung umfassen solche, die Ischämien verursachen oder durch Ischämien oder Ischämie/Reperfusion des Herzens verursacht werden. Beispiele sind Koronargefäßerkrankun- 15 gen (zum Beispiel Atherosklerose), Angina pectoris, Herzinfarkt, kardiovaskuläre Schäden durch Herzstillstand oder Bypass-Opera- tion.

Die erfindungsgemäßen Methoden können zur Behandlung von Krebs oder zur Sensitisierung von Krebszellen bei Bestrahlungstherapie 20 verwendet werden. Der Begriff "Krebs" ist im weitesten Sinne zu verstehen. Modulatoren der erfindungsgemäßen Proteine können als "Anti-Krebs Therapeutika" verwendet werden. Beispielhaft können die Methoden zur Behandlung von Krebsarten oder Tumorzellen, wie ACTH-produzierenden Tumoren, akuter lymphatischer oder lympho- 25 blastischer Leukämie; akuter oder chronischer lymphozytärer Leukämie; akuter nicht-lymphozytärer Leukämie; Blasenkrebs, Hirn- tumoren; Brustkrebs; Zervikalkarzinom; chronischer myelozytärer Leukämie; Darmkrebs; T-Zonen-Lymphom; Endometriose; Speis- eröhrenkrebs; Gallenblasenkrebs; Ewing Sarkom; Kopf- und Nacken- 30 krebs; Zungenkrebs; Hodgkin Lymphom; Kaposi Sarkom; Nierenkrebs; Leberkrebs; Lungenkrebs; Mesotheliom; multiplem Myelom; Neuro- blastom; non-Hodgkin Lymphom; Osteosarkom; Ovarialkarzinom; Glia- blastom; Mammakarzinom; Cervikalkarzinom; Prostatakrebs; Bauch- speicheldrüsenkrebs; Peniskrebs; Retinoblastom; Hautkrebs; Ma- 35 genkrebs, Schilddrüsenkrebs; Uteruskarzinom; Vaginalkarzinom; Wilm's Tumor; oder Trophoblastom verwendet werden.

"Radiosensitizer" oder "Bestrahlungs-Sensitisierer" im Sinne der Erfahrung betreffen Moleküle, die im Organismus die Sensitivität 40 der Zellen gegenüber einer Bestrahlung mit elektromagnetischer Strahlung (zum Beispiel Röntgenstrahlung) erhöhen oder diese Bes- trahlungsbehandlung beschleunigen. Bestrahlungs-Sensitisierer erhöhen die Empfindlichkeit von Krebszellen gegen die toxischen Effekte der elektromagnetischen Strahlung. In der Literatur sind 45 unter anderem Mitomycin C, 5-Bromdeoxyuridin und Metronidazol be- kannt. Anwendbar ist Strahlung mit Wellenlängen im Bereich von 10^{-20} bis 10 Metern, vorzugsweise gamma-Strahlung (10^{-20} bis 10^{-13}

m), Röntgenstrahlung (10⁻¹¹ bis 10⁻⁹ m), ultraviolette Strahlung (10 nm bis 400 nm), sichtbares Licht (400 nm bis 700 nm), Infrarotstrahlung (700 nm bis 1 mm) und Mikrowellenbestrahlung (1 mm bis 30 cm).

5

Erkrankungen die durch eine solche Therapie behandelt werden können, sind vor allem neoplastische Erkrankungen, gutartige oder bösartige Tumoren und Krebs. Die Behandlung anderer Erkrankungen unter Verwendung von elektromagnetischer Strahlung ist ebenfalls 10 möglich.

Die vorliegende Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die beiliegenden Figuren näher beschrieben. Dabei zeigt:

15 Figur 1 ein Sequenz-Alignment von menschlichem PARP (humanPARP1) und zwei erfindungsgemäß bevorzugte PARPs (humanPARP2, humanPARP3, murinPARP3). Sequenzübereinstimmungen zwischen humanPARP1 und humanPARP2, humanPARP3 bzw. murinPARP3 sind umrahmt dargestellt. Die Majoritätssequenz ist über dem Alignment angegeben.
20 Die Zink-Finger Motive von humanPARP1 befinden sich in den Sequenzabschnitten entsprechend den Aminosäureresten 21 bis 56 und 125 bis 162;

Figur 2 Northern Blots mit unterschiedlichen menschlichen Geweben 25 zur Veranschaulichung der Gewebeverteilung des erfindungsgemäßen PARP2 und PARP3-Moleküle. Bahn 1: Gehirn; Bahn 2: Herz; Bahn 3: Skelettmuskel; Bahn 4: Dickdarm; Bahn 5: Thymus; Bahn 6: Milz; Bahn 7: Niere; Bahn 8: Leber; Bahn 9: Dünndarm; Bahn 10: Plazenta; Bahn 11: Lunge; Bahn 12: Periphere Blutleukozyten; die jeweilige Lage der Größenstandards (kb) ist angegeben.

Figur 3 einen Northern Blot mit weiteren unterschiedlichen menschlichen Geweben zur Veranschaulichung der Gewebeverteilung des erfindungsgemäßen PARP3-Moleküls. Bahn 1: Herz; Bahn 2: Gehirn; Bahn 3: Plazenta; Bahn 4: Lunge; Bahn 5: Leber; Bahn 6: Skelettmuskel; Bahn 7: Niere; Bahn 8: Pankreas; die jeweilige Lage der Größenstandards (kb) ist angegeben.

Figur 4 einen Western Blot mit unterschiedlichen menschlichen Geweben 40 zur Veranschaulichung der Gewebeverteilung des erfindungsgemäßen PARP3-Moleküls auf Protein Ebene. Bahn 1: Herz; Bahn 2: Lunge; Bahn 3: Leber; Bahn 4: Milz; Bahn 5: Niere; Bahn 6: Dickdarm; Bahn 7: Muskel; Bahn 8: Hirn; die jeweilige Lage der Größenstandards (kD) ist angegeben.

45

Figur 5 einen Western Blot mit unterschiedlichen menschlichen Geweben zur Veranschaulichung der Gewebeverteilung des erfindungs-

gemäßen PARP3-Moleküls. Bahn 1: Frontaler Cortex; Bahn 2: Posterior Cortex; Bahn 3: Cerebellum; Bahn 4: Hippocampus; Bahn 5: Olfactory Bulb; Bahn 6: Striatum; Bahn 7: Thalamus; Bahn 8: Midbrain; Bahn 9: Entorhinal Cortex; Bahn 10: Pons; Bahn 11: Medulla; Bahn 12: Rückenmark.

Figur 6 eine schematische Darstellung des PARP-Assays (ELISA)

Figur 7 eine schematische Darstellung des PARP-Assays (HTRF)

10

Weitere bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

PARP-Homologe und funktionale Äquivalente

15

Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, werden im Rahmen der vorliegenden Beschreibung Aminosäuresequenzen beginnend mit dem N-Terminus angegeben. Wird der Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren verwendet, so steht G für Glycin, A für Alanin, V für Valin, 20 L für Leucin, I für Isoleucin, S für Serin, T für Threonin, D für Asparaginsäure, N für Asparagin, E für Glutaminsäure, Q für Glutamin, W für Tryptophan, H für Histidin, R für Arginin, P für Prolin, K für Lysin, Y für Tyrosin, F für Phenylalanin, C für Cystein und M für Methionin.

25

Die vorliegenden Erfindung ist nicht auf die oben konkret beschriebenen PARP-Homologen beschränkt. Vielmehr werden auch solche Homologen erfaßt, welche funktionale Äquivalente davon darstellen. Funktionale Äquivalente umfassen sowohl natürliche, wie 30 z.B. Spezies-spezifische oder Organ-spezifische, als auch künstlich erzeugte Varianten der hierin konkret beschriebenen Proteine. Erfindungsgemäße funktionale Äquivalente unterscheiden sich durch Addition, Substitution, Inversion, Insertion und/oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten von humanPARP2 35 (SEQ ID NO:2), humanPARP3 (SEQ ID NO: 4 und 6) und mausPARP3 (SEQ ID NO: 8 und 10), wobei wenigstens noch die NAD-Bindungsfunktion des Proteins, vermittelt durch eine funktionale katalytische C-terminale Domäne, erhalten bleibt. Ebenso sollte vorzugsweise die Poly(ADP-ribose)-erzeugende katalytische Aktivität erhalten bleiben. Funktionale Äquivalente umfassen gegebenenfalls auch solche 40 Varianten, in denen die Leucin-Zipper-ähnliche Region im wesentlichen erhalten bleibt.

Dabei können beispielsweise, ausgehend von der Sequenz für human-45 PARP2 oder humanPARP3 bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität etc.) ersetzt werden. Beispielsweise können Argi-

5 ninreste gegen Lysinreste, Valinreste gegen Isoleucinreste oder Asparaginsäurerreste gegen Glutaminsäurerreste ausgetauscht werden. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge vertauscht, hinzugefügt oder entfernt werden, oder es können mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden. Die 10 derart gegenüber der humanPARP2- oder humanPARP3-Sequenz veränderten Proteine besitzen wenigstens 60 %, bevorzugt wenigstens 75 %, ganz besonders bevorzugt wenigstens 85 % Homologie zur Ausgangssequenz, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 85(8), 1988, 2444-2448.

15 Folgende Homologien wurden auf Aminosäureebene bzw. DNA-Ebene zwischen humanPARP1, 2 und 3 bestimmt (FastA-Programm, Pearson und Lipman, a.a.O.):

20 Aminosäure-Homologien:

	Prozent Identität	Prozent Identität in PARP-Signature
PARP1/PARP2	41,97% (517)	86% (50)
PARP1/PARP3	33,81% (565)	53,1% (49)
PARP2/PARP3	35,20% (537)	53,1% (49)

25 Zahlen in Klammern geben die Anzahl der überlappenden Aminosäuren an.

30 DNA-Homologien:

	Prozent Identität im ORF	Prozent Identität in PARP-Signature
PARP1/PARP2	60,81% (467)	77,85% (149)
PARP1/PARP3	58,81% (420)	59,02% (61)
PARP2/PARP3	60,22% (269)	86,36% (22)

35 Zahlen in Klammern geben die Anzahl der überlappenden Nukleotide an.

40 Die erfindungsgemäßen Polypeptide lassen sich aufgrund der hohen Ähnlichkeit im Bereich der katalytischen Domäne als homologe Poly(ADP-ribose)polymerasen klassifizieren.

45 Erfindungswesentlich ist außerdem, daß die neuen PARP-Homologen keine herkömmlichen Zink-Finger Motive aufweisen. Das bedeutet, daß diese Enzyme nicht notwendigerweise oder in einer von PARP1 verschiedenen Weise in die DNA-Reparatur involviert sind, wohl aber noch ihren pathologischen Mechanism (NAD⁺-Verbrauch und somit Energieverbrauch durch ATP-Konsum) ausüben können. Die starke Proteinexpression vor allem von PARP3, die im Western-Blot zu be-

obachten ist, läßt eine bedeutende Rolle im NAD-Verbrauch vermuten. Dies ist von besonderer Bedeutung für die Wirkstoffentwicklung. Potentielle neue Inhibitoren gegen die erfindungsgemäßen Polymerasen können also die pathologischen Funktionen hemmen, 5 ohne negative Effekte auf die gewünschten physiologischen Eigenschaften zu haben. Mit Inhibitoren gegen die bislang bekannte PARPs war dies nicht möglich, da auch immer die DNA-Reparaturfunktion mitinhibiert wurde. Die potentiell mutagene Wirkung bekannter PARP-Inhibitoren ist somit leicht verständlich. Ferner 10 ist es denkbar, PARP-Inhibitoren so zu gestalten, daß sie mit hoher Affinität alle PARP-Homologen effektiv inhibieren. In diesem Fall ist gegebenenfalls eine potenzierte Wirkung denkbar.

Das erfindungsgemäß bevorzugte PARP-Homologe gemäß SEQ ID NO:2 15 (human PARP2) läßt sich vorteilhafterweise aus dem menschlichen Hirn, Herz, Skelettmuskel, Niere und Leber isolieren. In anderen Geweben oder Organen ist humanPARP2 deutlich schwächer exprimiert.

20 Das erfindungsgemäß bevorzugte PARP-Homologe gemäß SEQ ID NO: 4 und 6 (humanPARP3) läßt sich vorteilhafterweise aus dem menschlichen Hirn (hier bevorzugt aus dem Hippocampus), Herz, Skelettmuskel, Leber oder Niere isolieren. In anderen Geweben oder Organen, wie Muskel oder Leber, ist humanPARP3 deutlich schwächer exprimiert. 25

Der mit der Proteinisolierung vertraute Fachmann wird zur Gewinnung erfindungsgemäßer natürlicher PARPs aus Geweben oder erfindungsgemäßer rekombinant hergestellter PARPs aus Zellkulturen die 30 dazu jeweils am geeignetste Kombination von präparativen Verfahrensmaßnahmen ergreifen. Geeignete präparative Standardmethoden sind zum Beispiel beschrieben in Cooper, T.G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R. Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin. 35

Gegenstand der Erfindung sind außerdem PARP2- und PARP3-Homologe, welche zwar aus anderen eukaryotischen Spezies, d.h. Evertebraten (Invertebraten) oder Vertebraten, insbesondere anderen Säugern, 40 wie z.B. Maus, Ratte, Katze, Hund, Schwein, Schaf, Rind, Pferd, oder Affe oder aus anderen Organen, wie z.B. Myokard, isolierbar sind, aber die wesentlichen, von den erfindungsgemäßen PARPs vor-gegebenen strukturellen und funktionellen Eigenschaften besitzen.

45 Insbesondere das aus menschlichem Hirn isolierbare humanPARP2 und dessen funktionale Äquivalente sind bevorzugte Agenzien für die Entwicklung von Inhibitoren gegen neurodegenerative Erkrankungen,

wie z. B. Schlaganfall. Es kann nämlich angenommen werden, daß die Wirkstoffentwicklung, basierend auf PARP2 als Indikator, die Entwicklung von Inhibitoren ermöglicht, welche für die Anwendung an menschlichem Gehirn optimiert sind. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß auf Basis von PARP2 entwickelte Inhibitoren auch zur Therapierung PARP-vermittelter pathologischer Zustände anderer Organe einsetzbar sind (vgl. Gewebeverteilung der erfindungsgemäßen Proteine).

10 Ähnlich wie PARP1 werden auch PARP2 und vermutlich PARP3 durch geschädigte DNA, wenn auch durch einen vermutlich anderen Mechanismus aktiviert. Eine Bedeutung in der DNA-Reparatur ist denkbar. Die Blockade der erfindungsgemäßen PARPs würde auch in Indikationen, wie Krebs, von Nutzen sein (z.B. in der Radiosensitization von Tumorpatienten).

Eine weitere wesentliche biologische Eigenschaft von erfindungsgemäßen PARPs und deren funktionalen Äquivalenten ist in deren Befähigung zur Bindung eines Interaktionspartners zu sehen. Im Unterschied zur bislang bekannten PARPs aus höheren Eukaryoten, wie insbesondere Säugern, verfügen humanPARP2 und 3 über potentielle sogenannte Leucin-Zipper-Motive. Dies ist ein typisches Motiv für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Diese Motive erlauben möglicherweise eine Modulation der PARP-Aktivität durch einen Interaktionspartner. Somit liefert auch dieses zusätzliche Strukturelement einen möglichen Ansatzpunkt für die Entwicklung von PARP-Effektoren, wie z.B. Inhibitoren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind somit Proteine, die mit PARP2 und/oder 3 wechselwirken, bevorzugt solche, die ihre Aktivierung oder Inaktivierung bewirken.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind auch Proteine, die noch die oben genannte Ligandenbindungsaktivität aufweisen und die ausgehend von den konkret offenbarten Aminosäuresequenzen durch gezielte Veränderungen herstellbar sind.

Ausgehend von der Peptidsequenz der erfindungsgemäßen Proteine können synthetische Peptide generiert werden, die einzeln oder in Kombination als Antigene für die Produktion von polyklonalen oder monokonalen Antikörpern eingesetzt werden. Es ist auch möglich, das PARP-Protein oder Bruchstücke davon zur Generierung von Antikörpern einzusetzen. Gegenstand der Erfindung sind somit auch Peptidfragmente erfindungsgemäßer PARP-Proteine, welche charakteristische Teilsequenzen umfassen, insbesondere solche Oligo- oder Polypeptide, welche wenigstens eines der oben genannten Sequenzmotive umfassen. Solche Fragmente sind beispielsweise durch pro-

teolytischen Verdau von PARP-Proteinen oder auf chemischem Weg durch Peptidsynthese erhältlich.

5 Neue PARP2- und PARP3-Bindungspartner

Unter Verwendung der oben beschriebenen spezifischen Assay-Systeme für Bindungspartner von PARP2 und PARP3 wurden aktive und vorzugsweise selektive Inhibitoren gegen die erfundungsgemäßen 10 Proteine entwickelt. Diese Inhibitoren sind gegebenenfalls auch gegenüber PARP1 aktiv.

Erfundungsgemäß bereitgestellte Inhibitoren besitzt gegenüber PARP2 eine stark ausgeprägte inhibitorische Aktivität. Die 15 K_i -Werte können dabei weniger als etwa 1000 nM, wie z. B. weniger als etwa 700 nM, weniger als etwa 200 nM oder weniger als etwa 30 nM, wie z.B. etwa 1 bis 20 nM, betragen.

Erfundungsgemäß bereitgestellte Inhibitoren können außerdem eine 20 überraschende Selektivität für PARP2 besitzen. Das Verhältnis $K_i(\text{PARP1}) : K_i(\text{PARP2})$ für solche erfundungsgemäße Inhibitoren ist z.B. größer als 3 oder größer als 5, wie z. B. größer als 10, oder größer als 20.

25 Beispielhaft ist zu nennen 4-(N-(4-Hydroxyphenyl)aminomethyl)-(2H)-dihydrophthalazin-1-on. Die Herstellung dieser und analoger Verbindungen erfolgt entsprechend den Anweisungen in Puodzhyunas et al., Pharm. Chem. J., 1973, 7, 566f., oder Mazkanowa et al., Zh. Obshch. Khim., 1958, 28, 2798f., oder Mohamed et al., Ind. J. 30 Chem. B. 1994, 33, 769f., worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird.

Die oben genannte Verbindung besitzt gegenüber PARP2 einen K_i -Wert von 113 nM und wirkt gegenüber PARP2 etwa 8-fach selektiver als 35 gegenüber PARP1.

Für PARP-Homologe kodierende Nukleinsäuren:

Wenn keine anderen Angaben gemacht werden so erfolgt im Rahmen 40 der vorliegenden Beschreibung die Angabe der Nukleotidsequenzen von 5'- in 3'-Richtung.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuresequenzen, die für die oben genannten Proteine, insbesondere für solche mit 45 der in SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 und 10 dargestellten Aminosäuresequenz, kodieren, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein. Erfundungsgemäß brauchbare Nukleinsäuresequenzen umfassen auch Allel-

varianten, die, wie oben für die Aminosäuresequenzen beschrieben, durch Deletion, Inversion, Insertion, Addition und/oder Substitution von Nukleotiden, vorzugsweise von Nucleotiden gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 7 und 9, erhältlich sind, wobei die biologischen Eigen-
5 schaften bzw. die biologische Aktivität des korrespondierenden Genprodukts aber im wesentlichen erhalten bleibt. Brauchbare Nukleotidsequenzen erhält man beispielsweise durch Nukleotidsubstitutionen, welche stumme (ohne Veränderung der Aminosäuresequenz) oder konservative Aminosäure-Veränderungen (Austausch von
10 Aminosäuren gleicher Größe, Ladung, Polarität oder Löslichkeit) bewirken.

Weiterhin umfassen erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen auch funktionelle Äquivalente der Gene, wie eukaryontische Homologe
15 beispielsweise aus Evertebraten, wie Caenorhabditis oder Drosophila, oder Vertebraten, vorzugsweise aus den oben beschriebenen Säugern. Bevorzugt sind Gene aus Vertebraten, die für ein Genprodukt kodieren, das die oben beschriebenen, erfindungswesentlichen Eigenschaften besitzt.

20

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können in herkömmlicher Weise auf verschiedenen Wegen erhalten werden:

Beispielsweise kann eine genomische oder eine cDNA-Bibliothek auf
25 DNA durchmustert werden, die für ein PARP-Molekül oder einen Teil davon kodiert. Beispielsweise kann eine aus menschlichem Gehirn, Herz oder Niere gewonnene cDNA-Bibliothek mit einer geeigneten Sonde, wie z.B einem markierten Einzelstrang-DNA-Fragment durchmustert werden, die einer aus SEQ ID NO: 1 oder 3 ausgewählten
30 Teilsequenz geeigneter Länge oder dazu komplementären Sequenz entspricht. Dazu können beispielsweise die in einen geeigneten Klonierungsvektor überführten DNA-Fragmente der Bibliothek nach Transformation in ein Bakterium auf Agarplatten ausplattiert werden. Die Klone können anschließend auf Nitrozellulose-Filter
35 übertragen und nach Denaturierung der DNA mit der markierten Sonde hybridisiert werden. Positive Klone werden dann isoliert und charakterisiert.

Die für erfindungsgemäße PARP-Homologe oder Teilfragmente kodierende DNA kann auch ausgehend von den in vorliegender Anmeldung enthaltenen Sequenzinformationen chemisch synthetisiert werden. Beispielsweise können hierfür Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 100 Basen in an sich bekannter Weise synthetisiert und sequentiell ligiert werden, indem man beispielsweise geeignete terminale Restriktionsschnittstellen vorsieht.

Die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen sind auch mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) herstellbar. Dazu hybridisiert man eine Target-DNA, wie z.B. DNA aus einem geeigneten Full- Length-Klon, mit einem Paar synthetischer Oligonukleotid-Primer 5 von etwa 15 Basen Länge, welche an den gegenüberliegenden Enden der Target-DNA binden. Anschließend wird der dazwischenliegende Sequenzabschnitt mit DNA-Polymerase aufgefüllt. Die mehrfache Wiederholung dieses Cyclus erlaubt eine Amplifizierung der Target-DNA (vgl. White et al. (1989), Trends Genet. 5, 185)

10

Weiterhin sind unter den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen auch verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der kodierenden und nichtkodierenden, komplementären DNA-Sequenzen, mRNA-Sequenzen und davon abgeleitete cDNAs zu verstehen.

15

Die Erfindung umfaßt weiterhin die mit obigen Sequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisierenden Nukleotidsequenzen. Stringente Hybridisierungsbedingungen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind gegeben, wenn die hybridisierenden Sequenzen eine 20 Homologie von etwa 70 bis 100%, wie z.B. etwa 80 bis 100% oder 90 bis 100%, aufweisen (vorzugsweise in einem Aminosäureabschnitt von mindestens etwa 40, wie z.B. etwa 50, 100, 150, 200, 400 oder 500 Aminosäuren).

25 Stringente Bedingungen für das Screening von DNA, insbesondere cDNA-Banken, sind z.B. gegeben, wenn man bei einer Temperatur von etwa 60°C mit 0,1X SSC-Puffer (20X SSC-Puffer = 3M NaCl, 0,3M Na-triumcitrat, pH 7,0) und 0,1% SDS den Hybridisierungsansatz wäscht.

30

Northern-Blot-Analysen werden unter stringenten Bedingungen beispielweise bei einer Temperatur von etwa 65 °C mit 0,1X SSC, 0,1% SDS gewaschen.

35 Nukleinsäurederivate und Expressionskonstrukte:

Unter den Nukleinsäuresequenzen sind auch Derivate, wie beispielweise Promotorvarianten oder alternative Spleißvarianten, zu verstehen. Die Promotoren, die den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen unter operativer Verknüpfung vorgeschalten sind, 40 können dabei durch Nukleotidaddition(en) oder -substitution(en), Inversion(en), Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt wird. Des weiteren können die Promotoren 45 durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden. Oben beschriebene Promotorvarianten werden

zur Herstellung von erfindungsgemäßen Expressionskassetten herangezogen.

Als konkrete Beispiele für humanPARP2-Spleißvarianten sind zu 5 nennen:

Variante humanPARP2a: Deletion der Basenpaare 766 bis 904 (vgl. SEQ ID NO:1). Dies führt zu einem Frame-Shift mit einem neuen Stop-Codon ("TAA" gemäß Nucleotiden 922 bis 924 in SEQ ID NO:1).

10 Variante humanPARP2b: Insertion von

5'- gta tgc cag gaa ggt cat ggg cca gca aaa ggg tct ctg -3' nach Nukleotid 204 (SEQ ID NO:1). Dies verlängert die Aminosäuresequenz um den Einschub: GMPGRSWASKRVS

15 Unter Nukleinsäurederivaten sind auch Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenzen im Bereich von -1 bis -1000 vor dem Startkodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression erhöht wird.

20 Neben der oben beschriebenen Nukleotidsequenz umfassen erfindungsgemäß brauchbare Nukleinsäurekonstrukte in funktioneller, operativer Verknüpfung einer oder mehrerer weiterer regulativer Sequenzen, wie Promotoren, Amplifikationssignale, Enhancer, Polyadenylierungssequenzen, Replikationsursprünge, Reportergene, se- 25 lektierbare Markergene und dergleichen. Diese Verknüpfung kann je nach gewünschter Anwendung zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Genexpression führen.

Zusätzlich zu den neuen Regulationssequenzen kann die natürliche 30 Regulationssequenz vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt, es werden keine zusätzlichen Regulationssequenzen vor die Strukturgene insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Stattdessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Auch am 3'-Ende der Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte regulatorische Elemente 40 insertiert werden. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Expressionsverfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, l-PR- oder im l-PL-Promotor

enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefepromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH oder in den 5 Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden. 10

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus be-15 deuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugs-20 weise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung 25 der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Unter "Enhancer" sind beispielsweise DNA-Sequenzen zu verstehen, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase 30 und DNA eine erhöhte Expression bewirken.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale 35 Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise 40 Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

45 Expression der Konstrukte:

Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

10

Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate oder des rekombinanten Nukleinsäurekonstrukts ermöglichen. Unter 15 Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen Escherichia, wie z.B. Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus oder Pseudomonas, eukaryotische Mikroorganismen, wie Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen, Schafen oder 25 transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Bei den transgenen Organismen kann es sich auch um sogenannte Knock-Out Tiere oder Pflanzen handeln, in denen das korrespondierende endogene Gen ausgeschaltet wurde, wie z.B. durch Mutation oder partielle oder vollständige Deletion.

30

Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter System, die Phagen λ , μ oder andere temperante Phagen oder Transposons und/ 35 oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem. Bevorzugt sind unter dem Begriff Expressionssysteme beispielsweise die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen, und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

40

Wie oben beschrieben, kann das Genprodukt vorteilhaft auch in transgenen Tieren, z.B. Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Ebenso ist es möglich, zellfreie Translationssysteme mit der von der Nukleinsäure abgeleiteten RNA 45 zu programmieren.

Darüberhinaus kann das Genprodukt auch in Form therapeutisch oder diagnostisch geeigneter Fragmente exprimiert werden. Zur Isolierung des rekombinanten Proteins können vorteilhaft Vektorsysteme oder Oligonukleotide verwendet werden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z.B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation, oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z.B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

25 Herstellung von Antikörpern:

Die Herstellung von Anti-PARP2-Antikörpern erfolgt in einer dem Fachmann geläufigen Weise. Mit Antikörpern sind sowohl polyklonale, monoklonale, humane oder humanisierte Antikörper oder Fragmente davon, single chain Antikörper oder auch synthetische Antikörper gemeint, ebenso wie Antikörperfragmente, wie Fv, Fab und F(ab)'2. Geeignete Herstellungsverfahren sind z.B. beschrieben in Campbell, A.M., *Monoclonal Antibody Technology*, (1987) Elsevier Verlag, Amsterdam, New York, Oxford und in Breitling, F. und Düb, S., *Rekombinante Antikörper* (1997), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Weitere Anwendung der kodierenden Sequenz:

40 Die vorliegende cDNA bietet außerdem die Voraussetzung, die genomische Sequenz der neuen PARP-Gene zu klonieren. Darunter fallen auch die dazugehörigen regulatorischen oder Promotorsequenzen, die beispielsweise durch Sequenzierung des 5'-stromaufwärts gelegenen Bereiches der erfindungsgemäßen cDNA zugänglich sind oder 45 in den Introns der Gene zu finden sind. Die Sequenzinformation der cDNA ist auch die Grundlage für die Herstellung von Antisense-Molekülen oder Ribozymen mit Hilfe bekannter Methoden (vgl.

Jones, J.T. und Sallenger, B.A. (1997) Nat. Biotechnol. 15, 902; Nellen, W. und Lichtenstein, C. (1993) TIBS, 18, 419). Die genomische DNA kann ebenfalls zur Herstellung der oben beschriebenen Genkonstrukte verwendet werden.

5

Eine weitere Möglichkeit des Einsatzes der Nukleotidsequenz oder Teilen davon ist die Erzeugung transgener Tiere. Transgene Überexpression oder genetischer Knockout der Sequenzinformation in geeigneten Tiermodellen kann wertvolle weitere Informationen über 10 die (Patho-)Physiologie der neuen Gene liefern.

Therapeutische Anwendungen:

In Situationen, in denen ein Mangel an einem erfindungsgemäßen 15 Protein herrscht, können mehrere Methoden zur Substituierung eingesetzt werden. Zum einen kann das Protein, natürlich oder rekombinant direkt, oder gentherapeutisch in Form seiner kodierenden Nukleinsäure (DNA oder RNA) appliziert werden. Dazu können beliebige Vektoren beispielsweise sowohl virale, als auch nichtvirale 20 Vehikel zum Einsatz kommen. Geeignete Methoden werden beispielsweise beschrieben von Strauss und Barranger in Concepts in Gene Therapy (1997), Walter de Gruyter, Hrsg. Eine weitere Alternative bietet die Stimulation des endogenen, körpereigenen Genes durch geeignete Mittel.

25

Auch der turn-over oder die Inaktivierung erfindungsgemäßer PARPs, z.B. durch Proteasen, können blockiert werden. Schließlich können Inhibitoren oder Agonisten erfindungsgemäßer PARPs zum Einsatz gelangen.

30

In Situationen, in denen überschüssiges PARP oder überaktiviertes PARP vorliegt, können unterschiedliche Typen von Inhibitoren eingesetzt werden. Diese Inhibition kann sowohl durch Antisense-Moleküle, Ribozyme, Oligonukleotide oder Antikörper, als auch durch 35 niedermolekulare Verbindungen erreicht werden.

Die erfindungsgemäßen Wirkstoffe, d.h. PARP-Proteine, Nukleinsäuren und PARP-Bindungspartner, wie z.B. Antikörper oder Modulatoren, können entweder als einzelne therapeutische Wirkstoffe oder 40 als Mischungen mit anderen therapeutischen Wirkstoffen verabreicht werden. Sie können als solche verabreicht werden, im Allgemeinen werden sie jedoch in Form pharmazeutischer Mittel verabreicht, d.h. als Mischungen des oder der Wirkstoffe mit wenigstens einem geeigneten pharmazeutischen Träger oder Verdünnungsmittel. Die Wirkstoffe oder Mittel können auf jedem für den je-

weiligen therapeutischen Zweck geeigneten Weg, z.B. oral oder parenteral, verabreicht werden.

Die Art des pharmazeutischen Mittels und des pharmazeutischen Trägers bzw. Verdünnungsmittels hängt von der gewünschten Verabreichungsart ab. Orale Mittel können beispielsweise als Tabletten oder Kapseln vorliegen und können übliche Exzipienten enthalten, wie Bindemittel (z.B. Sirup, Akazia, Gelatine, Sorbit, Tragant oder Polyvinylpyrrolidon), Füllstoffe (z.B. Lactose, Zucker, Maisstärke, Calciumphosphat, Sorbit oder Glycin), Gleitmittel (z.B. Magnesiumstearat, Talcum, Polyethyenglykol oder Siliciumdioxid), disintegrerende Mittel (z.B. Stärke) oder Netzmittel (z.B. Natriumlaurylsulfat). Orale flüssige Präparate können in Form wässriger oder öliger Suspensionen, Lösungen, Emulsionen, Sirupen, Elixieren oder Sprays usw. vorliegen oder können als Trockenpulver zur Rekonstitution mit Wasser oder einem anderen geeigneten Träger vorliegen. Derartige flüssige Präparate können übliche Additive, beispielsweise Suspendiermittel, Geschmacksstoffe, Verdünnungsmittel oder Emulgatoren, enthalten. Für die parenterale Verabreichung kann man Lösungen oder Suspensionen mit üblichen pharmazeutischen Trägern einsetzen. Die parenterale Applikation erfindungsgemäßer Wirkstoffe erfolgt vorteilhaft erweise unter Verwendung eines parenteral, insbesondere intravenös verabrechbaren, flüssigen pharmazeutischen Mittels. Dieses enthält vorzugsweise in einem für diesen Zweck geeigneten, pharmazeutisch akzeptablen Träger, eine wirksame Menge wenigstens eines Wirkstoffs, vorzugsweise in gelöster Form. Beispiele hierfür geeigneter pharmazeutische Träger sind insbesondere wässrige Lösungen, wie z.B. physiologische Kochsalzlösung, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, Ringerlösung, laktierte Ringerlösung und dergleichen. Außerdem kann das Mittel weitere Zusätze, wie Antioxidantien, chelatbildende Mittel oder antimikrobielle Mittel, enthalten.

Die jeweilige Wahl der Dosierung der erfindungsgemäßen Wirkstoffe und der jeweilige Dosierungsplan obliegen der Entscheidung des behandelnden Arztes. Dieser wird in Abhängigkeit vom gewählten Verabreichungsweg, von der Wirksamkeit des jeweiligen Medikaments, von der Art und Schwere der zu behandelnden Erkrankung, von dem Befinden des Patienten und dessen Ansprechen auf die Therapie einen geeignete Dosis und einen entsprechenden Dosierungsplan auswählen. So können z.B. die erfindungsgemäßen pharmakologisch wirksamen Substanzen an ein Säugetier (Mensch und Tier) in Dosen von etwa 0,5 mg bis etwa 100 mg pro kg Körpergewicht pro Tag verabreicht werden. Sie können in einer Einzeldosis oder in mehreren Dosen verabreicht werden.

Nicht-therapeutische Anwendungen:

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, wie z.B. cDNA, die genomische DNA, der Promotor, als auch das Polypeptid, 5 sowie Teilfragmente davon in rekombinanter oder nichtrekombinanter Form zur Ausarbeitung von verschiedenen Testsystemen verwendet werden.

Beispielsweise kann ein Testsystem etabliert werden, das geeignet 10 ist, die Aktivität des Promotors oder des Proteins in Anwesenheit einer Testsubstanz zu messen. Bevorzugt handelt es sich dabei um einfache, z.B. colorimetrische, luminometrische, fluorimetrische, immunologische oder radioaktive, Meßmethoden, die die schnelle 15 Meßbarkeit, vorzugsweise einer Vielzahl von Testsubstanzen erlauben. Derartige Tests eignen sich vorteilhaft für ein sogenanntes High-Throughput-Screening. Diese Testsysteme erlauben eine Bewertung von Testsubstanzen in Bezug auf deren Bindung an oder deren 20 Agonisierung, Antagonisierung oder Inhibition von erfindungsgemäßen Proteinen.

20

Die Bestimmung von Menge, Aktivität und Verteilung der erfindungsgemäßen Proteine oder ihrer zugrundeliegenden mRNA im menschlichen Körper kann zur Diagnose, zur Bestimmung der Prädisposition und zum Monitoring bei bestimmten Erkrankungen dienen. 25 Desgleichen kann die Sequenz der cDNA sowie der genomischen Sequenz zu Aussagen über genetische Ursachen und Prädispositionen bestimmter Erkrankungen herangezogen werden. Dazu können sowohl DNA/RNA-Sonden als auch Antikörper verschiedenster Art benutzt werden. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen 30 oder Teile davon in Form geeigneter Sonden zur Aufdeckung von Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen dienen.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Proteine benutzt werden, um ihre natürlichen Liganden oder Interaktionspartner zu bestimmen und zu isolieren. Außerdem können die erfindungsgemäßen Proteine benutzt werden, um künstliche oder synthetische Liganden zu bestimmen und zu isolieren. Dazu kann man das rekombinant hergestellte oder gereinigte natürliche Protein derart derivatisieren, daß es Modifikationen trägt, die eine Verknüpfung mit Trägermaterialien erlauben. Derart gebundenen Proteine können mit unterschiedlichen Analyten, wie z.B. Proteinextrakten oder Peptidbibliotheken oder anderen Quellen für Liganden, inkubiert werden. Spezifisch gebundene Peptide, Proteine oder niedermolekulare, nichtproteinogene Substanzen können so isoliert und charakterisiert werden. Unter nichtproteinogenen Substanzen sind beispielsweise niedermolekulare, chemische Substanzen zu verstehen, die beispielsweise aus der klassischen Wirkstoffsynthese oder aus so-

genannten Substanzbibliotheken stammen können, die mit Hilfe der Kombinatorik synthetisiert worden sind.

Die verwendeten Proteinextrakte sind beispielsweise abgeleitet 5 aus Homogenaten von Pflanzen oder Pflanzenteilen, Mikroorganismen, menschlichen oder tierischen Geweben oder Organen.

Liganden oder Interaktionspartner können ferner durch Verfahren, wie das Hefe "Two-Hybrid-System" identifiziert werden (Fields, S. 10 und Song, O. (1989) *Nature*, 340, 245). Die dabei einsetzbaren Expressionsbanken sind beispielsweise ableitbar aus menschlichen Geweben, wie z.B. Gehirn, Herz, Niere usw.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen und die von ihnen ko- 15 dierten Proteine können zur Entwicklung von Reagenzien, Agonisten und Antagonisten oder Inhibitoren zur Diagnose und Therapie von chronischen und akuten Erkrankungen, die mit der Expression oder Aktivierung einer der erfindungsgemäßen Proteinsequenzen, wie z.B. mit deren erhöhter oder erniedrigter Expression assoziiert 20 sind, eingesetzt werden. Die entwickelten Reagenzien, Agonisten, Antagonisten oder Inhibitoren können anschließend zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungen zur Behandlung oder Diagnose von Krankheiten verwendet. Dabei kann es sich beispielsweise um Erkrankungen des Gehirns, des peripheren Nervensystems, des Herz- 25 Kreislaufsystems oder des Auges, von septischem Schock, der rheumatischen Arthritis, Diabetes, akutes Nierenversagen, oder von Krebs handeln.

Die Relevanz der erfindungsgemäßen Proteine für die genannten In- 30 dikationen wurde mittels spezifischer Inhibitoren in relevanten Tiermodellen verifiziert.

Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

35

Beispiel 1: Isolierung der PARP2- und PARP3-cDNA

Bei der Sequenzanalyse von cDNA-Klonen einer cDNA-Bibliothek aus 40 menschlichem Gehirn (Human Brain 5'Stretch Plus cDNA Library, # HL3002a, Fa. Clontech) wurden die vorliegenden cDNA-Sequenzen erstmalig gefunden. Die Maus PARP3 Klonen wurden aus einer "Lambda-Triplex mouse brain cDNA library" (Clontech Bst.-Nr. ML5004t) isoliert. Die Sequenzen dieser Klonen sind in SEQ ID NO:1, 3, 7 und 9 beschrieben.

45

Beispiel 2: Expression von PARP2 bzw. PARP3 in menschlichen Geweben

Die Expression von humanPARP2 bzw. humanPARP3 wurde in zwölf verschiedene 5 menschlichen Geweben mittels Northern Blot-Analyse untersucht. Ein "Human Multiple Tissue Northern Blot (MTNTM)" der Firma Clontech (#7760-1 und #7780-1) wurde dazu mit einer RNA-Sonde hybridisiert. Die Sonde wurde durch in vitro Transkription der entsprechenden cDNA von humanem PARP2 bzw. humanem PARP3 in 10 Anwesenheit Digoxigenin-markierter Nukleotide nach Vorschrift des Herstellers (BOEHRINGER MANNHEIM DIG Easy Hyb Best. Nr. 1603 558, DIG Easy Hyb Vorschrift für RNA:RNA Hybridisierung) hergestellt. In Abänderung des Protokolls wurde die Vorhybridisierung: 2x1h unter Zugabe von Heringssperma DNA (10mg/ml Hybridisierungslösung) 15 durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte dann über Nacht unter Zugabe von Heringssperma DNA (10mg/ml Hybridisierungslösung). Die Detektion der Banden erfolgte unter Verwendung des CDP-Star Protokolls (BOEHRINGER MANNHEIM CDP-StarTM Best. Nr. 1685 627).

20 Nach stringenter Waschung wurde das Transkript von PARP2 hauptsächlich im menschlichen Hirn, Herz, Skelettmuskel, Niere und Leber nachgewiesen. Die Größe des Transkriptes von ca. 1.9 kb entspricht der Länge der bestimmten cDNA (1.85kb) (vgl. Figur 2(A)).

25 In anderen Geweben oder Organen ist humanPARP2 deutlich schwächer exprimiert.

Nach stringenter Waschung wurde die Expression des Transkripts 30 von PARP3 hauptsächlich im Herzen, Gehirn, Niere, Skelettmuskel und Leber nachgewiesen. Die Expression in weiteren Geweben (Plazenta, Lunge, Bauchspeicheldrüse) ist deutlich schwächer (vgl. Figur 2(B)). Zu humanPARP3 gibt es mindestens 2 Transkripte, die vermutlich durch unterschiedliche Polyadenylierungsstellen oder 35 alternatives Spleißen zu erklären sind. Deren Größe (ca. 2,2 kb bzw. 2,5 kb) entspricht der Länge der bestimmten cDNA (2.3kb). Gewaschen wurde 2 x 5 Minuten mit 0,2 x SSC/0,2 % SDS bei Raumtemperatur und dann 2 x 15 Minuten mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei 65 °C (hergestellt aus 20X SSC: 3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat, pH 7,0).

40 Beispiel 3: Herstellung von Antikörpern

Spezifische Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Proteine wurden hergestellt. Diese dienten u.a. der Analyse der Gewebeverteilung 45 auf Proteinebene von PARP2 und PARP3 durch Immunoblot

(Western-Blot) Analyse. Beispiele für die Herstellung solcher Antikörper sind im Folgenden angegeben.

Folgende Peptide wurden für die Antikörperherstellung synthetisch in der dem Fachmann geläufigen Weise hergestellt. Teilweise wurden den Sequenzen ein Cystein-Rest N- oder C-terminal angehängt, um die Kopplung an KLH (key hole limpet hemocyanin) zu erleichtern.

10 PARP-2: NH₂-MAARRRSTGGGRARALNES-CO₂H (Aminosäuren 1-20;
SEQ ID NO:23)
NH₂-KTELQSPEHPLDQHYRNLHC-CO₂H (Aminosäuren 335-353;
SEQ ID NO:24))
PARP-3: NH₂-CKGRQAGREEDPFRSTAELALK-CO₂H (Aminosäuren 25-44;
15 SEQ ID NO:25)
NH₂-CKQQIARGFEALEALEEALK-CO₂H (Aminosäuren 230-248;
SEQ ID NO:26)

Als repräsentatives Beispiel ist die Herstellung eines Anti-PARP3 20 Antikörpers erläutert.

Für das humane PARP3 wurden polyklonale Antikörper in Kaninchen unter Verwendung eines synthetischen Peptides mit der Peptid-Sequenz H₂N-KQQIARGFEALEALEEALK-CO₂H (SEQ ID NO:27) generiert (Aminosäuren 230-248 der humanen PARP3 Proteineinsequenz). Die entsprechende Maussequenz in diesem Bereich unterscheidet sich lediglich um eine Aminosäure (H₂N-KQQIARGFEALEALEEAMK-CO₂H; SEQ ID NO:28). N-Terminal wurde noch ein Cystein angehängt, um die Kopplung des Proteins an KLH zu ermöglichen.

30 Kaninchen wurden im Abstand von 7-14 Tagen insgesamt fünfmal mit dem KLH-Peptidkonjugat immunisiert. Das gewonnene Antiserum wurde gegen das Antigen affinitätsgereinigt. Die Isolierung der spezifischen IgG-Fraktion aus Serum erfolgte mittels der jeweiligen Peptide, die dazu zunächst in der dem Fachmann geläufigen Weise auf einer Affinitätssäule immobilisiert wurden. Auf diese Affinitätssäule wurde das jeweilige Antiserum gegeben, nichtspezifisch sorbierte Proteine wurden mit Puffer eluiert. Die spezifisch gebundene IgG-Fraktion wurde mit 0,2 M Glycin/HCl-Puffer pH 2,2 eluiert. Der pH-Wert wurde sofort mit einem 1M TRIS/HCl-Puffer pH 7,5 erhöht. Das Eluat mit der IgG-Fraktion wurde 1 : 1 (Volumen) mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt und 30 min bei +4°C zur Komplettierung der Fällung inkubiert. Der entstandene Niederschlag wurde bei 10.000 g zentrifugiert, vom Überstand befreit 45 und in möglichst wenig PBS/TBS gelöst. Die entstandene Lösung wurde anschließend gegen PBS/TBS im Verhältnis 1 : 100 (Volumen) dialysiert. Die Antikörper wurden auf eine Konzentration von ca.

100 µg IgG/ml eingestellt. Die so aufgereinigten PARP3 Antikörper hatten eine hohe Spezifität gegenüber PARP3. Während mausPARP3 gut erkannt wurde, war keine Kreuzreaktion mit PARP1 oder PARP2 zu beobachten.

5

Beispiel 4: Analyse der Gewebeverteilung mittels Immunoblots (Western Blot)

Die Gewebeverteilung auf Proteinebene wurde für PARP2 und PARP3 10 ferner durch Immunoblot (Western-Blot) Analyse untersucht.

Aufbereitung der Maus-Gewebe für Proteingele:

Gewebe oder Zellen wurden mittels Potter oder Ultra-Turrax homogenisiert. Dazu wurden 0.5g Gewebe (oder Zellen) in 5ml Puffer 15 (10 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA, 6 mM MgCl₂), eine Tablette Proteasen Inhibitoren-Cocktail (Boehringer Mannheim, Best.Nr.: 1836153) und Benzonase (Reinheitsgrad I, MERCK) 30 min. bei 37 °C inkubiert. Es wurden Gewebeproben aus der Maus für Herz, 20 Lunge, Leber, Milz, Niere, Darm, Muskel, Gehirn und für humane embryonale Nierenzellen (HEK293, human embryonal kidney) hergestellt.

Protein-Gele:

25

Für Protein-Gele wurde das NuPAGE-System der Firma NOVEX gemäß Vorschrift verwendet. Zum Einsatz kamen Polyacrylamidgele (NuPAGE 4-12% BisTris, NOVEX NP 0321), Laufpuffer (MES-Running Buffer, NOVEX NP 0002), Anti-Oxidant (NOVEX NP 0005), Protein-Größenstandard (Multi Mark Multi Colored Standard, NOVEX LC 5725), Probenpuffer (NuPAGE LDS Sample Buffer (4X), NOVEX NP 0007). Die Laufzeit der Gele betrug 45 Minuten bei einer Spannung von 200V.

Western Blot:

35

Western Blots wurden mit dem System der Firma NOVEX nach Vorschrift durchgeführt. Verwendet wurde eine Nitrocellulose-Membran (Nitrocellulose Pore size 45 µm, NOVEX LC 2001). Die Transferzeit betrug 1 Stunde bei einer Stromstärke von 200mA. Der Transferpuffer bestand aus 50 ml Transferpuffer Konzentrat (NOVEX NP 0006), 1 ml Anti-Oxidant (NOVEX NP 0002), 100 ml Methanol p.a. und 849 ml H₂O bidest.

Neben den so hergestellten Blots wurden zudem vorgefertigte 45 Blots, z.B. der Firma Chemicon (Mouse Brain Blot, Chemicon, Katalog Nr.: NS 106 mit den Geweben 1. Frontal Cortex, 2. Posterior Cortex, 3. Cerebellum, 4. Hippocampus, 5. Olfactory bulb,

6. Striatum, 7. Thalamus, 8. Mittelhirn, 9. Entorhinal Cortex,
10. Pons, 11. Medulla, 12. Rückenmark) verwendet.

Antikörperreaktion gegen PARP3:

5

Die Western-Blots wurden mindestens 2 Stunden in TBST (TBS + 0,3 % Tween 20) mit 5% Trockenmilchpulver blockiert (TBS: 100 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl). Die Antikörperreaktion mit dem primären Antikörper (1:1000 Verdünnung) erfolgte für mindestens 2 10 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln (Überkopfschüttler) in TBST mit 5% Trockenmilchpulver (siehe oben). Anschließend wurde dreimal für 5 Minuten in TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Rabbit IgG, Peroxidase gekoppelt, SIGMA A-6154, Verdünnung 15 1:2.000) erfolgte 1 Stunde in TBST mit 5% Trockenmilchpulver. Anschließend wurde wie oben dreimal je 5 Minuten gewaschen. Es folgte die Detektion basierend auf Chemilumineszenz mit dem SUPER BLAZE Kit (Pierce, Signal BLAZE Chemiluminescent Substrate 34095) nach Angabe der Herstellers. Verwendet wurde der "Lumi-Film" 20 (Chemiluminescent Detection Film, Boehringer Best.Nr.: 1666916). Die Filme wurden ca. 2 min. entwickelt (Röntgenentwicklerkonzentrat, ADEFO-Chemie GmbH), gewässert, ca. 4 min. fixiert (Acidofix 85 g/l /AGFA), gewässert und abschließend getrocknet.

25

Beispiel 5: Herstellung der Enzyme

Humanes PARP1 wurde zum Vergleich rekombinant im Baculovirus-System in der dem Fachmann geläufigen Weise exprimiert und wie beschrieben (Shah et al., Analytical Biochemistry 1995, 227, 1-13) partiell aufgereinigt. Rinder PARP1 in einer 30-50%igen Reinheit (c= 0,22 mg/ml, spez. Aktivität 170 nmol ADP-ribose/min/mg Gesamtprotein bei 25 °C) wurde von BIOMOL (Best.-Nr. SE-165) bezogen. Humanes und Maus PARP2 und PARP3 wurden rekombinant im Baculovirus-System (Bac-to-Bac System, BRL LifeScience) exprimiert. 30 Dazu wurden die entsprechenden cDNAs in den pFASTBAC-1-Vektor kloniert. Nach Herstellung von rekombinanter Baculovirus-DNA durch Rekombination in E. coli, erfolgte Transfektion von Insektenzellen (Sf9 oder High-Five) mit den entsprechenden rekombinanten Baculovirus-DNAs. Die Expression der entsprechenden Proteine 35 wurde durch Western-Blot-Analyse verifiziert. Virenstämme wurden in der dem Fachmann geläufigen Weise amplifiziert. Größere Mengen rekombinanter Proteine wurden durch Infektion von 500 ml Insektenzellkultur (2 x 10⁶ Zellen/ml, mit Viren in einer MOI (multiplicity of infection; Verhältnis von Viren zu Zellen) von 5-10 40 45

infiziert und 3 bis 4 Tage inkubiert) hergestellt. Anschließend wurden die Insektenzellen durch Zentrifugation pelletiert und die Proteine aus dem Pellet aufgereinigt.

5 Die Aufreinigung erfolgte durch klassische, dem Fachmann geläufige Methoden der Proteinreinigung unter Detektion der Enzyme mit entsprechenden spezifischen Antikörpern. Teilweise wurden die Proteine auch über eine 3-Aminobenzamid/Affinitätssäule wie beschrieben (Burtscher et al., Anal Biochem 1986, 152:285-290) af-
10 finitätsgereinigt. Die Reinheit betrug >90%.

Beispiel 6: Testsysteme für die Bestimmung der Aktivität PARP2 und PARP3 und der Inhibitorischen Wirkung von Effektoren auf
15 PARP1, PARP2 und PARP3.

a) Herstellung von Antikörpern gegen Poly-(ADP-ribose)

Als Antigen zur Generierung von Anti-Poly-(ADP-ribose) Antikörpern kann Poly-(ADP-ribose) verwendet werden. Die Herstellung von Anti-Poly-(ADP-ribose) Antikörpern ist in der Literatur beschrieben. (Kanai Y et al. (1974) Biochem Biophys Res Comm 59:1, 300-306; Kawamaitsu H et al. (1984) Biochemistry 23, 3771-3777; Kanai Y et al. (1978) Immunology 34, 501-508).

Unter anderem wurden verwendet: Anti Poly-(ADP-ribose)-Antikörper (polyklonales Antiserum, Kaninchen), BIOMOL; Best.-Nr. SA-276. Anti Poly-(ADP-ribose)-Antikörper (monoklonal, Maus; Klon 10H; Hybridomaüberstand, affinitätsgereinigt).

30 Die Antiseren oder aus Hybridomakulturüberstand gewonnenen monoklonalen Antikörper wurden durch eine Protein-A-Affinitätschromatographie in der dem Fachmann geläufigen Weise aufgereinigt.

35 b) ELISA

Materialien:

ELISA Farbreagenz: TMB-Fertigmix SIGMA T-8540

40 Eine 96-well Mikrotiterplatte (FALCON Micro-Test III™ Flexible Assay Plate, # 3912) wurde mit Histonen (SIGMA, H-7755) beschichtet. Histone wurden hierfür in Carbonatpuffer (0.05M Na₂HCO₃; pH 9.4) in einer Konzentration von 50 µg/ml gelöst. Die einzelnen 45 Wells der Mikrotiterplatte wurden mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit je 150 µl dieser Histon-Lösung inkubiert. Anschließend werden die Wells durch Zugabe von

150 µl einer 1%igen BSA-Lösung (SIGMA, A-7888) in Carbonatpuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Es folgen drei Waschschritte mit Waschpuffer (0,05% Tween10 in 1x PBS; PBS (Phosphate buffered saline; Gibco, Best.-Nr. 10010): 0.21g/l KH₂PO₄, 5 9g/l NaCl, 0.726g/l Na₂HPO₄ · 7H₂O, pH 7.4). Waschschritte wurden durchweg mit einem Mikrotiterplatten-Waschgerät durchgeführt (Mikrotiterplatten-Wäscher "Columbus", SLT-Lab-instruments, Österreich).

10 Für die Enzymreaktion wurden eine Enzymreaktionslösung und eine Substratlösung jeweils als "Pre-Mix" benötigt. Die absolute Menge dieser Lösungen richtete sich nach der Anzahl der vorgesehenen Test-Wellen.

15 Zusammensetzung der Enzymreaktionslösung pro Well:

- 4 µl PARP-Reaktionspuffer (1M Tris-HCl pH 8.0, 100mM MgCl₂, 10mM DTT)
- 20ng PARP1 (human oder bovin) oder 8ng PARP2 (Human oder Maus)
- 4 µl aktivierte DNA (1 mg/ml; SIGMA, D-4522)

20 - ad 40 µl H₂O

Zusammensetzung der Substrat-Lösung pro Well:

- 5 µl PARP-Reaktionspuffer (10x)
- 0.8 µl NAD-Lösung (10mM, SIGMA N-1511)

25 - 44 µl H₂O

Inhibitoren wurden in 1x PARP-Reaktionspuffer gelöst. DMSO, das gelegentlich zum Lösen von Inhibitoren in höheren Konzentrationen verwendet wurde, war bis zu einer Endkonzentration von 2% unproblematisch. Für die Enzymreaktion wurden 40 µl der Enzymreaktionslösung pro Well vorgelegt und mit 10 µl Inhibitor-Lösung für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zugebung von 50 µl Substrat-Lösung pro Well gestartet. Die Reaktion wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt und anschließend 35 durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer gestoppt.

Als primäre Antikörper wurden spezifische Anti-Poly-(ADP-ribose) Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte in Antikörper-Puffer (1% BSA in PBS; 0,05% Tween20). Die 40 Inkubationszeit für den primären Antikörper betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus-IgG, Fab-Fragmente, Peroxidase gekoppelt, Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 1500.686; 45 Anti-Rabbit-IgG, Peroxidase gekoppelt, SIGMA, Best.-Nr. A-6154) in einer 1:10000 Verdünnung in Antikörperpuffer. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer folgte die Farbreaktion unter Verwendung

von 100 μ l Farbreagenz (TMB-Fertigmix, SIGMA) pro Well für ca. 15 min. bei Raumtemperatur. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l 2M H₂SO₄ gestoppt. Danach wurde sofort im ELISA-Platten-Lesegerät ("Easy Reader" EAR340AT, SLT-LabInstruments, Österreich) 5 gemessen (450nm gegen 620nm). Das Messprinzip ist schematisch in Figur 6 dargestellt.

Für die Ermittlung des K_i -Wertes eines Inhibitors wurden verschiedene Konzentrationen zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve 10 herangezogen. Für eine bestimmte Inhibitorkonzentration werden 3fach-Werte erhoben. Arithmetische Mittelwerte werden mit Microsoft© Excel ermittelt. Die IC₅₀-Bestimmung erfolgt mit der Microcal© Origin Software (Vers. 5.0) ("Sigmoidal Fit"). Umrechnung 15 der so berechneten IC₅₀-Werte auf K_i -Werte erfolgte durch Verwendung von "Eich-Inhibitoren". Die "Eich-Inhibitoren" wurden bei jeder Analyse mitgemessen. Der K_i -Werte der "Eich-Inhibitoren" wurde im gleichen Testsystem durch Dixon-Diagramm Analyse in der dem Fachmann geläufigen Weise ermittelt.

20 b) HTRF-(Homogenous time-resolved fluorescence) Assay

Beim erfindungsgemäßen HTRF-PARP-Assay werden Histone als Zielproteine der Modifikation durch PARP indirekt mit einem XL665-Fluorophor markiert. Der Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper 25 wird direkt mit einem Europium-Kryptat markiert (Anti-PAR-Kryptat). Befindet sich das XL665-Fluorophor in einer unmittelbaren räumlichen Nähe, die durch eine Bindung an die Poly-(ADP-ribose) am Histon gewährleistet wird, dann ist eine Energieübertragung möglich. Die Emission bei 665 nm ist somit direkt proportional zu 30 der Menge an gebundenem Antikörper, der wiederum der Poly-(ADP-ribose) Menge entspricht. Somit entspricht das gemessene Signal der PARP Aktivität. Das Meßprinzip ist schematisch in Figur 7 dargestellt. Die verwendeten Materialien sind, wenn nicht ausdrücklich angegeben, identisch mit denen im ELISA (s.o.) verwenden. 35

Histone wurden in Hepes-Puffer (50mM, pH=7.5) zu 3mg/ml gelöst. Biotinylierung erfolgte mit Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, #21335T). Ein molares Verhältnis von 4 Biotin-Molekülen pro Histone 40 ston wurde verwendet. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten (RT). Anschließend wurden die biotinylierten Histone über eine G25 SF HR10/10 Säule (Pharmacia, 17-0591-01) in Hepes Puffer (50mM, pH=7.0) aufgereinigt, um überschüssiges Biotinylierungsreagenz zu entfernen. Der Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper wurde mittels 45 bifunktionaler Kopplungsreagenzien mit Europium-Kryptat markiert (Lopez, E. et al., Clin. Chem. 39(2), 196-201 (1993); US-Patent 5,534,622). Die Reinigung erfolgte auf einer G25SF HR10/30 Säule.

41

Ein molares Verhältnis von 3.1 Kryptaten pro Antikörper wurde erzielt. Die Ausbeute betrug 25%. Die Konjugate wurden in Gegenwart von 0.1% BSA in Phosphatpuffer (0.1M, pH=7) bei -80°C gelagert.

5 Für die Enzymreaktion wurden pro Well zusammenpipettiert:

- 10 µl PARP-Lösung in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl₂, 1mM DTT) mit 20ng PARP1 (human oder bovin) oder 8ng PARP2 (Human oder Maus)
- 10 µl aktivierte DNA in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (50µg/ml)
- 10 - 10 µl biotinylierte Histone in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (1.25µM)
- 10 µl Inhibitor in PARP-HTRF-Reaktionspuffer

Diese Reagenzien wurden 2 Minuten vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von

- 10 µl NAD-Lösung in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (41 µM/ml) gestartet wurde. Die Reaktionszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur.

20 Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von

- 10 µl PARP-Inhibitor (25 µM, $K_i=10\text{nM}$) in "Revelation"-Puffer (100mM Tris-HCl pH 7.2, 0.2M KF, 0.05% BSA) gestoppt.

25 Danach wurden zugegeben:

- 10 µl EDTA-Lösung (SIGMA, E-7889, 0.5M in H₂O)
- 100 µl Sa-XL665 (Packard Instruments) in "Revelation"-Puffer (15-31.25nM)
- 50 µl Anti-PAR-Kryptat in "Revelation"-Puffer (1.6-3.3nM).

30

Nach 30 Minuten (bis 4 Stunden) konnte dann gemessen werden. Die Messung erfolgte auf einem "Discovery HTRF Microplate Analyzer" (Canberra Packard Instruments). Die Berechnung der K_i -Werte erfolgte wie beim ELISA beschrieben.

35

Beispiel 7: Testsysteme zur Bestimmung der therapeutischen Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren

40 Neue PARP-Inhibitoren können in relevanten pharmakologischen Modellen auf ihre therapeutische Wirksamkeit überprüft werden. Beispiele für einige geeignete Modelle sind dazu in Tabelle 1 aufgeführt.

	Krankheit	Modell	Literatur
5	Neurodegenerative Erkrankungen (Schlaganfall, Parkinson etc.)	NMDA-Exzitotoxizität in der Maus oder Ratte	Beschreibung siehe unten
10	Schlaganfall	Permanente MCAO ("middle cerebral arterial occlusion")	Tokime, T. et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18(9): 991-7, 1998. Guegan, C., Brain Research. Molecular Brain Research, 55(1): 133-40, 1998.
15		Transiente, fokale MCAO in Ratte oder Maus	Eliasson MJL et al., Nat Med 1997, 3:1089-1095.
20			Endres, M et al., J Cereb Blood Flow Metab 1997, 17:1143-1151. Takahashi K et al., J Cereb Blood Flow Metab 1997, 17:1137-1142.
25	Parkinsonsche Krankheit	MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridin) Toxizität in der Maus/Ratte	Cosi C, et al., Brain Res., 1998 809(1):58-67. Cosi C, et al., Brain Res., 1996 729(2):264-9.
30	Herzinfarkt	Koronargefäß-Okklusion an Ratte, Schwein oder Kaninchen	Richard V, et al., Br. J. Pharmacol 1994, 113, 869-876. Thiemermann C, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1997, 94(2):679-83. Zingarelli B, et al., Cardiovasc Res. 1997, 36(2):205-15.
35			
40			
		Langendorffherzmodell an Ratte oder Kaninchen	Beschreibung siehe unten
45	Septischer Schock	Endotoxin Schock in der Ratte	Szabo C, et al., J Clin Invest, 1997, 100(3):723-35.

5	Zymosan oder Carrageenan induziertes multiples Organversagen in Ratte oder Maus	Szabo C, et al. J Exp Med. 1997, 186(7):1041-9. Cuzzocrea S, et al. Eur J Pharmacol. 1998, 342(1):67-76.
10	Rheumatoide Arthritis	Adjuvant oder Collagen induzierte Arthritis in Ratte oder Maus
15	Diabetes	Streptozotocin und Alloxan induziert bzw. Obesity assoziiert
20	Krebs	In vitro-Modell; s.u.

20 a) Modell der NMDA-Exzitotoxizität

Glutamat ist der wichtigste exzitorische Neurotransmitter im Gehirn. Unter normalen Bedingungen wird Glutamat in den synaptischen Spalt ausgeschüttet und stimuliert die post-synaptischen Glutamat-Rezeptoren, spezifisch die Glutamat-Rezeptoren vom "NMDA"- und "AMPA"-Typ. Diese Erregung spielt eine bedeutende Rolle bei zahlreichen Hirnfunktionen einschließlich Lernen, Gedächtnis und motorische Kontrolle.

30 Unter Bedingungen der akuten und chronischen Neurodegeneration (z.B. Schlaganfall) erfolgt jedoch ein starker Anstieg der prä-synaptischen Glutamat-Ausschüttung, was eine exzessive Stimulation der Rezeptoren zur Folge hat. Dies führt zum Zelltod der entsprechend erregten Zellen. Bei einer Reihe von neurologischen Krankheiten oder psychischen Störungen treten diese erhöhten Glutamat-Aktivitäten auf, die zu Zuständen von Übererregungen oder toxischen Effekten im zentralen Nervensystem (ZNS) aber auch im peripheren Nervensystem führen. Somit ist Glutamat in eine Vielzahl neurodegenerativen Erkrankungen involviert, insbesondere neurotoxischen Störungen nach Hypoxie, Anoxie, Ischämie und nach Läsionen, wie sie nach Schlaganfall und Trauma auftreten, Schlaganfall, Alzheimersche Erkrankung, Huntington-Erkrankung, Amyotrophe Laterale Sklerose (ALS; "Lou Gehrigs"-Erkrankung), Kopf-Trauma, Rückenmarks-Trauma, periphere Neuropathien, AIDS Demenz und die Parkinsonsche Krankheit. Eine weitere Erkrankung in der Glutamat-Rezeptoren von Bedeutung sind, ist Epilepsie. (vgl.

Brain Res Bull 1998; 46(4):281-309, Eur Neuropsychopharmacol 1998, 8(2):141-52.).

Glutamat vermittelt seine Effekte über verschiedene Rezeptoren. 5 Einer dieser Rezeptoren wird nach einem spezifischen Agonisten NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor genannt. (Arzneim.Forschung 1990, 40, 511-514; TIPS, 1990, 11, 334-338; Drugs of the Future 1989, 14, 1059-1071). N-Methyl-D-aspartat ist ein starker Agonist einer bestimmten Klasse von Glutamat-Rezeptoren ("NMDA"-Typ). Die 10 Erregung des NMDA-Rezeptors führt zum Calcium-Einstrom in die Zelle und zur Erzeugung von Radikalen. Die Radikale führen zur DNA-Schädigung und zur Aktivierung von PARP. PARP wiederum verursacht durch eine Depletion der Zelle an energiereichen Phosphaten (NAD und ATP) den Zelltod. Dies erklärt die Toxizität von NMDA. 15 Behandlung von Tieren mit NMDA kann daher als Modell gesehen werden für die oben genannten Erkrankungen, bei denen Exzitotoxizität eine Rolle spielt.

Aufgrund der Bedeutung der Glutamat-Rezeptoren in der Neurodegeneration waren viele pharmakologische Ansätze bislang darauf gerichtet, eben diese Rezeptoren spezifisch zu blockieren. Aufgrund ihrer Bedeutung in der normalen Reizleitung haben sich diese Ansätze jedoch als problematisch erwiesen (Nebenwirkungen). Zudem ist die Erregung der Rezeptoren ein sehr schnell erfolgendes Er- 25 eignis, so daß die Applikation der Rezeptoren oft zu spät kommt ("Zeitfenster"-Problem). Der Bedarf an neuen Wirkprinzipien und Inhibitoren der NMDA-bedingten Neurotoxizität ist daher hoch.

30 Der Schutz gegen zerebrale Übererregung durch exzitatorische Aminosäuren (NMDA-Antagonismus an der Maus) kann als hinreichender Beleg der Wirksamkeit eines pharmakologischen Effektors von PARP in Erkrankungen beruhend auf Exzitotoxizität gelten. Durch intrazerebrale Applikation von exzitatorischen Aminosäuren EAA (Excitatory Amino Acids) wird eine so massive Übererregung induziert, 35 daß diese in kurzer Zeit zu Krämpfen und zum Tod der Tiere (Maus) führt.

Im vorliegenden Fall wurden 10 µl einer 0.035%igen wäßrigen NMDA- 40 Lösung 120 Minuten nach intraperitonealer Gabe (ip.-Gabe) der zu prüfenden Substanz einseitig intracerebroventrikulär appliziert. Durch systemische, z.B. intraperitoneale, Gabe von zentralwirksamen Wirkstoffen lassen sich diese Symptome hemmen. Da die exzessive Aktivierung von EAA-Rezeptoren des Zentralnervensystems in 45 der Pathogenese verschiedener neurologischer Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielt, kann aus dem nachgewiesenen EAA-Antagonismus in vivo auf eine mögliche therapeutische Verwendbarkeit

der Substanzen gegen derartige ZNS-Erkrankungen geschlossen werden. Als Maß für die Wirksamkeit der Substanzen wurde ein ED50-Wert bestimmt, bei dem 50% der Tiere durch eine festgelegte Dosis von NMDA durch die vorangegangene ip-Gabe der Meßsubstanz 5 symptomfrei werden.

b) Langendorffherzmodell (Model für Herzinfarkt)

Für den Test wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Körpergewicht 300-400 g; Herkunft Janvier, Le Genest-St-Isle, France) verwendet. Die Ratten wurden oral mittels Schlundsonde mit der Wirksubstanz oder Placebo behandelt (Volumen: 5 ml/kg). 50 Minuten später wird Heparin intraperitoneal appliziert (Liquemin N Roche, 125 IU/animal in 0.5 ml). Die Tiere werden mit Inactin® (T133 (Thiobetabarbital Natrium, 10 %) anaesthetisiert, auf dem Operationstisch fixiert, tracheotomisiert und mit einer "Harvard Atempumpe" (40 Schläge/min, 4.5 ml/Schlag) beatmet. Der Thorakotomie folgt eine sofortige Katheterisierung der Aorta, Exstirpation des Herzens und sofortige retrograde Perfusion. Die Herzen wurden mit einem konstanten Druck von 75 mmHg perfundiert, was mittels einer "Gilson Minipuls 2 Perfusionspumpe" erreicht wird. Zusammensetzung des Perfusats (mmol/l): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ x 2 H₂O 2.52, MgSO₄ x 7 H₂O 1.64, NaHCO₃ 24.88, KH₂PO₄ 1.18, Glukose 11. Die Temperatur wird während des gesamten Experimentes auf 25 37 °C gehalten. Funktionelle Parameter wurden mittels eines "Gould 4-Kanal-Schreibers" kontinuierlich aufgezeichnet. Gemessen wurden der linksventrikuläre Druck (LVP; mmHg), LVEDP (mmHg), Enzymfreisetzung (Creatinkinase, mU/ml/g), Koronarflußrate (ml/min), HR (Pulsfrequenz, min⁻¹). Der links-ventrikuläre Druck wurde 30 mittels eines flüssigkeitgefüllten Latexballons und eines Druckaufnehmers-Statham23 Db gemessen. Das Volumen des Ballons wurde anfänglich angepaßt, um einen LVEDP (left ventricular end diastolic pressure) von ca.12 mmHg zu erreichen. Dp/dt_{max} (maximale Pumpkraft) wird aus dem Drucksignal mittels eines Differentiator- 35 moduls abgeleitet. Die Herzfrequenz wurde aus dem Drucksignal errechnet. Die Flußrate wurde mittels Tropfenzähler (BMT Messtechnik GmbH Berlin) bestimmt. Nach einer Äquilibrierzeit von 20 Minuten, wurden die Herzen einer 30 minütigen globalen Ischämie unterworfen, die durch den Stop der Perfusatzufuhr bei Temperierung auf 37 °C realisiert wird. Während der folgenden Reperfusionsperiode von 60 Minuten wurden Proben des Perfusats nach 3, 5, 10, 15, 30, 45 und 60 min zur Analyse der Creatinkinase (CK) Aktivität entnommen. Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Parameter wurden statistisch analysiert (Dunnett Test). 45 Die Signifikanzgrenze lag bei p=0.05.

Ähnlich wurde der Versuch an Kaninchenherzen durchgeführt. Ver-

wendet wurden männliche, weiße Neuseeländer Kaninchen (Bezug: Interfauna). Die Präparation der Herzen erfolgte wie oben im Rat-tenmodell beschrieben. Der Perfusionsdruck wurde auf maximal 60 mmHg, der Fluß auf ca 25ml/min eingestellt. Die Äquilibrierzeit 5 betrug ca 30 min. Die Substanzapplikation erfolgte per Infusion direkt vor das Herz. 15 min nach Start der Infusion wurde eine 30 minütige globale Ischämie durch stop-flow unter Temperierung des Herzens gesetzt. Es folgt eine 30 minütige Reperfusion. Abnahme von Perfusat für Untersuchung von CK-Aktivität erfolgte vor Sub-10 stanzgabe, nach 15 min, und zu verschiedenen Zeitpunkten (5, 10, 15, 20, 30 min) während der Reperfusion. Gemessen wurden die Pa-rameter: LVP (mmHg), LVEDP, LVdp/dt, PP (mmHg), HR (Pulsfrequenz; Schläge/min), CK-Aktivität (U/min/g Herzgewicht).

15 c) Tiermodell für akutes Nierenversagen

Untersucht wurde die protektive Wirkung von PARP-Inhibitoren bei einer intravenösen Gabe (4 Tage) auf die Nierenfunktion von Rat-ten mit postischämischem akutem Nierenversagen.

20

Verwendet wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (ca. 330g bei Versuchsbeginn; Züchter: Charles River). Es wurden 10-15 Tiere pro Versuchsgruppe eingesetzt. Die Applikation von Wirksubstanz/Placebo erfolgte kontinuierlich mit osmotischer Mikropumpe in die 25 v. femoralis. Blutabnahme erfolgte orbital (1,5ml Vollblut) unter Inhalationsnarkose mit Enfluran (Ethrane Abbott, Wiesbaden).

Nach Ermittlung der Vorwerte (Blutentnahme) und Bestimmung der in 24h ausgeschiedenen Urinmenge wurden die Ratten narkotisiert 30 ("Nembutal", Pentobarbital-Natrium, Sanofi CEVA; 50mg/kg i.p., Injektionsvolumen 1,0 ml/kg) und auf einem heizbaren OP-Tisch (37°C) befestigt. Es folgte Heparingabe (Liquemin N, Roche) 125 IU/kg i.v. in die Vena caudalis. Der Bauchraum wurde eröffnet und die rechte Niere freigelegt. Die abzweigende Nierenarterie wurde 35 freigelegt und mit Bulldogklemmen (nach Diefenbach 38mm) von oben her abgeklemmt. Die linke Nierenarterie wurde ebenfalls freige- legt und abgeklemmt (von oben her, ca. 1/2 Strecke zur Niere). Während der Operation wurde eine osmotische Mikropumpe in die v. femoralis implantiert. Der Darm wurde wieder eingefügt und der 40 Flüssigkeitsverlust mit lauwarmer 0,9 % NaCl ausgeglichen. Die Tiere wurden mit einem feuchten Tuch abgedeckt und unter Rotlicht warm gehalten. Nach 40 min wurde das Aussehen der Nieren dokumen-tiert und rechts, danach links die Klammer entfernt. Der Darm wurde zurückgelegt und 2 Tropfen Antibiotikum (Tardomyocel, 45 Bayer) wurden zugegeben. Die Bauchdecke wurde mit steriles Catgut (Ethicon Nr.4) geschlossen und nochmals mit 1 Tropfen Antibiotikum behandelt. Die Oberhaut wurde mit steriles Ethibond Exel (Ethi-

con) Nr.3/0 genäht und die Naht mit Wundspray Nebacetin N (Yamouchi) besprüht. Ein Zehntel Tagesdosis Wirkstoff/Placebo wird als Bolus i.v. geben.

5 Für die Versuchstage 1, 2 und 4 erfolgte Proben- und Blutentnahme für die Untersuchung klinisch chemischer Parameter in Serum und Urin: Na, K, Creatinin, Protein (nur in Urin). Ferner wurden Futter- und Wasserverbrauch, Körpergewicht und Urinvolumen festgehalten. Nach 14 Tagen wurden die Tiere getötet und die Nieren be-
10 10 gutachtet.

Für die Auswertung wurden alle Tiere, die während des Versuchs an einem Infarkt verstarben, bzw bei Sektion am Tag 14 einen Infarkt aufwiesen, ausgeschlossen. Berechnet wurden die Creatinin-Cle-
15 rance und die fraktionale Natriumexkretion als Nierenfunktionspa-
rameter unter Vergleich von behandelten Tieren mit Kontrolle und Sham.

d) In vitro-Modell für die Radiosensitisierung (Tumortherapie)

20 MCF-7-Zellen (humanes Brustkarzinom) wurden in Dulbecco's modifi-
ziertem Eagles Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 2 mM L-
Glutamin kultiviert. Zellen wurden über Nacht ausgesät in Zell-
dichten von 100, 1000 oder 10000 Zellen pro Well in einer 6-Well-
25 Platte und anschließend einer ionisierenden Strahlung mit einer
Dosis in einem Bereich von 0 bis 10 Gy (^{137}Cs , Shepard Mark, Model
I-68A, Dosisrate von 3,28 Gy/min) ausgesetzt. 10 Tage nach der
Bestrahlung wurde der Versuch ausgewertet, wobei Kolonien mit 50
Zellen als positiv gezählt wurden.

30 e) Schlaganfallmodell (Fokale cerebrale Ischämie; MCA (mittlere
cerebrale Arterie) Okklusion an der Ratte.

Eine fokale Ischämie wurde durch Kauterisierung der rechten di-
35 stalen MCA in Sprague-Dawley- oder Long-Evans-Ratten realisiert.
Die Ratten können vor oder nach dem Beginn der MCA-Okklusion mit
Modulatoren der erfindungsgemäßen Proteine behandelt werden. In
der Regel werden Dosierungen von 1-10 mg/kg gewählt (Bolus-Appli-
kation), gegebenenfalls gefolgt von einer Dauerinfusion von 0,5-5
40 mg/kg/h. Die Ratten werden mit Halothan in einer Mischung aus
70 % Stickstoff und 30 % Sauerstoff anesthetisiert (4 % zur Einlei-
tung und 0,8-1,2 % während der Operation). Die Körpertemperatur
wurde permanent rektal gemessen und auf $37,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ mittels
einer regulierbaren Heizdecke konstant gehalten. Ferner wurden
45 gegebenenfalls über einen Schwanzvenenkatheter der arterielle
Druck, arterieller pH, PaO_2 und PaCO_2 gemessen. Die fokale Ischä-
mie wurde anschließend gemäß der Methode von Chen et al. (Stroke

17: 738-743; 1986) oder Liu et al. (Am. J. Physiol. 256: H589-593; 1989) mittels permanenter Kauterisierung des distalen Teils der rechten MCA durchgeführt. Nach Beendigung der Operation wurden die Tiere in einer warmen Umgebung für weitere 24 Stunden gehalten. Anschließend werden sie unter Verwendung von CO₂ getötet und dekapitiert. Die Gehirne werden unverzüglich entnommen, schockgefroren (Trockeneis oder flüssiger Stickstoff) und bei -80 °C gelagert. Die Hirne werden in 0,02 mm dicke Scheiben geschnitten, wobei jeder zwanzigste Schnitt für die anschließende Analyse herangezogen wird. Die entsprechenden Schnitte werden mit Kresyl-violett gefärbt (Nissl-Färbung). Alternativ kann mit TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) gefärbt werden. Das Infarktvolumen kann anschließend unter dem Mikroskop ausgewertet werden. Zur exakten Quantifizierung kann eine computerunterstützte Bildauswertungssoftware herangezogen werden (J. Cereb. Blood Flow Metabol. 10: 290-293; 1990).

f) Septischer Schock

20 Gruppen von jeweils 10 männlichen C57/BL-Mäusen (Körpergewicht 18-20 g) werden mit LPS (Lipopolysaccharid aus E. coli, LD₁₀₀ = 20 mg/Tier i. v.) plus Galactosamin (20 mg/Tier i. v.) behandelt. Die zu testende Substanz wird i. p. oder i. v. über drei aufeinander folgende Tage appliziert (zum Beispiel 1-10 mg/kg), wobei 25 die erste Dosis 30 Minuten nach der LPS-Applikation gegeben wird. Die Sterblichkeitsquote wird alle 12 h ermittelt. Alternativ kann die Substanz auch in mehreren über die Tage verteilten Dosen appliziert werden.

30 g) Bestimmung der veränderten Genexpression in alternden Zellen

Die Alterung von Zellen wird durch Änderung von Zellkulturmedien von komplettem Medium auf Medium mit einer reduzierten Serumkonzentration simuliert und anschließend mittels quantitativer PCR oder Northern Blot analysiert (Linskens et al., Nucleic Acids Res. 1995; 23(16): 3244-51). Als typische Marker für die Alterung der Haut können z. B. Kollagen oder Elastin fungieren. Zum Einsatz kommen humane Fibroblasten oder Fibroblastenzelllinien, die die Alterung der Haut wiedergeben können. Modulatoren der erfundensgemäßen Proteine werden in das Medium gegeben und ihre Auswirkung auf die Änderung der Genexpression wird beobachtet. Eine erhöhte Elastinproduktion in Zellen mit durch die Modulatoren reduziertem Alterungsprozess kann beobachtet werden.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE:
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 67065

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neue Poly ADP Ribose Polymerase Gene

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 28

(iv) COMPUTER LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC DOS/MS DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1843 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (F) GEWEBETYP: Brain

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 3..1715
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Poly ADP Ribose Polymerase"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CC ATG GCG GCG CGG CGG CGA CGG AGC ACC GGC GGC GGC AGG GCG AGA
 Met Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg
 1 5 10 15

47

GCA TTA AAT GAA AGC AAA AGA GTT AAT AAT GGC AAC ACG GCT CCA GAA
 Ala Leu Asn Glu Ser Lys Arg Val Asn Asn Gly Asn Thr Ala Pro Glu
 20 25 30

95

GAC TCT TCC CCT GCC AAG AAA ACT CGT AGA TGC CAG AGA CAG GAG TCG	143
Asp Ser Ser Pro Ala Lys Lys Thr Arg Arg Cys Gln Arg Gln Glu Ser	
35 40 45	
AAA AAG ATG CCT GTG GCT GGA GGA AAA GCT AAT AAG GAC AGG ACA GAA	191
Lys Lys Met Pro Val Ala Gly Gly Lys Ala Asn Lys Asp Arg Thr Glu	
50 55 60	
GAC AAG CAA GAT GAA TCT GTG AAG GCC TTG CTG TTA AAG GGC AAA GCT	239
Asp Lys Gln Asp Glu Ser Val Lys Ala Leu Leu Lys Gly Lys Ala	
65 70 75	
CCT GTG GAC CCA GAG TGT ACA GCC AAG GTG GGG AAG GCT CAT GTG TAT	287
Pro Val Asp Pro Glu Cys Thr Ala Lys Val Gly Lys Ala His Val Tyr	
80 85 90 95	
TGT GAA GGA AAT GAT GTC TAT GAT GTC ATG CTA AAT CAG ACC AAT CTC	335
Cys Glu Gly Asn Asp Val Tyr Asp Val Met Leu Asn Gln Thr Asn Leu	
100 105 110	
CAG TTC AAC AAC AAG TAC TAT CTG ATT CAG CTA TTA GAA GAT GAT	383
Gln Phe Asn Asn Asn Lys Tyr Tyr Leu Ile Gln Leu Leu Glu Asp Asp	
115 120 125	
GCC CAG AGG AAC TTC AGT GTT TGG ATG AGA TGG GGC CGA GTT GGG AAA	431
Ala Gln Arg Asn Phe Ser Val Trp Met Arg Trp Gly Arg Val Gly Lys	
130 135 140	
ATG GGA CAG CAC AGC CTG GTG GCT TGT TCA GGC AAT CTC AAC AAG GCC	479
Met Gly Gln His Ser Leu Val Ala Cys Ser Gly Asn Leu Asn Lys Ala	
145 150 155	
AAG GAA ATC TTT CAG AAG AAA TTC CTT GAC AAA ACG AAA AAC AAT TGG	527
Lys Glu Ile Phe Gln Lys Lys Phe Leu Asp Lys Thr Lys Asn Asn Trp	
160 165 170 175	
GAA GAT CGA GAA AAG TTT GAG AAG GTG CCT GGA AAA TAT GAT ATG CTA	575
Glu Asp Arg Glu Lys Phe Glu Lys Val Pro Gly Lys Tyr Asp Met Leu	
180 185 190	
CAG ATG GAC TAT GCC ACC AAT ACT CAG GAT GAA GAG GAA ACA AAG AAA	623
Gln Met Asp Tyr Ala Thr Asn Thr Gln Asp Glu Glu Thr Lys Lys	
195 200 205	
GAG GAA TCT CTT AAA TCT CCC TTG AAG CCA GAG TCA CAG CTA GAT CTT	671
Glu Glu Ser Leu Lys Ser Pro Leu Lys Pro Glu Ser Gln Leu Asp Leu	
210 215 220	
CGG GTA CAG GAG TTA ATA AAG TTG ATC TGT AAT GTT CAG GCC ATG GAA	719
Arg Val Gln Glu Leu Ile Lys Leu Ile Cys Asn Val Gln Ala Met Glu	
225 230 235	
GAA ATG ATG ATG GAA ATG AAG TAT AAT ACC AAG AAA GCC CCA CTT GGG	767
Glu Met Met Glu Met Lys Tyr Asn Thr Lys Lys Ala Pro Leu Gly	
240 245 250 255	
AAG CTG ACA GTG GCA CAA ATC AAG GCA GGT TAC CAG TCT CTT AAG AAG	815
Lys Leu Thr Val Ala Gln Ile Lys Ala Gly Tyr Gln Ser Leu Lys Lys	

260	265	270	
ATT GAG GAT TGT ATT CGG GCT GGC CAG CAT GGA CGA GCT CTC ATG GAA Ile Glu Asp Cys Ile Arg Ala Gly Gln His Gly Arg Ala Leu Met Glu 275	280	285	863
GCA TGC AAT GAA TTC TAC ACC AGG ATT CCG CAT GAC TTT GGA CTC CGT Ala Cys Asn Glu Phe Tyr Thr Arg Ile Pro His Asp Phe Gly Leu Arg 290	295	300	911
ACT CCT CCA CTA ATC CGG ACA CAG AAG GAA CTG TCA GAA AAA ATA CAA Thr Pro Pro Leu Ile Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys Ile Gln 305	310	315	959
TTA CTA GAG GCT TTG GGA GAC ATT GAA ATT GCT ATT AAG CTG GTG AAA Leu Leu Glu Ala Leu Gly Asp Ile Glu Ile Ala Ile Lys Leu Val Lys 320	325	330	1007
ACA GAG CTA CAA AGC CCA GAA CAC CCA TTG GAC CAA CAC TAT AGA AAC Thr Glu Leu Gln Ser Pro Glu His Pro Leu Asp Gln His Tyr Arg Asn 340	345	350	1055
CTA CAT TGT GCC TTG CGC CCC CTT GAC CAT GAA AGT TAC GAG TTC AAA Leu His Cys Ala Leu Arg Pro Leu Asp His Glu Ser Tyr Glu Phe Lys 355	360	365	1103
GTG ATT TCC CAG TAC CTA CAA TCT ACC CAT GCT CCC ACA CAC AGC GAC Val Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Ser Thr His Ala Pro Thr His Ser Asp 370	375	380	1151
TAT ACC ATG ACC TTG CTG GAT TTG TTT GAA GTG GAG AAG GAT GGT GAG Tyr Thr Met Thr Leu Leu Asp Leu Phe Glu Val Glu Lys Asp Gly Glu 385	390	395	1199
AAA GAA GCC TTC AGA GAG GAC CTT CAT AAC AGG ATG CTT CTA TGG CAT Lys Glu Ala Phe Arg Glu Asp Leu His Asn Arg Met Leu Leu Trp His 400	405	410	1247
GGT TCC AGG ATG AGT AAC TGG GTG GGA ATC TTG AGC CAT GGG CTT CGA Gly Ser Arg Met Ser Asn Trp Val Gly Ile Leu Ser His Gly Leu Arg 420	425	430	1295
ATT GCC CCA CCT GAA GCT CCC ATC ACA GGT TAC ATG TTT GGG AAA GGA Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys Gly 435	440	445	1343
ATC TAC TTT GCT GAC ATG TCT TCC AAG AGT GCC AAT TAC TGC TTT GCC Ile Tyr Phe Ala Asp Met Ser Ser Lys Ser Ala Asn Tyr Cys Phe Ala 450	455	460	1391
TCT CGC CTA AAG AAT ACA GGA CTG CTG CTC TTA TCA GAG GTA GCT CTA Ser Arg Leu Lys Asn Thr Gly Leu Leu Leu Ser Glu Val Ala Leu 465	470	475	1439
GGT CAG TGT AAT GAA CTA CTA GAG GCC AAT CCT AAG GCC GAA GGA TTG Gly Gln Cys Asn Glu Leu Leu Glu Ala Asn Pro Lys Ala Glu Gly Leu 480	485	490	1487
CTT CAA GGT AAA CAT AGC ACC AAG GGG CTG GGC AAG ATG GCT CCC AGT			1535

Leu Gln Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Met Ala Pro Ser		
500	505	510
TCT GCC CAC TTC GTC ACC CTG AAT GGG AGT ACA GTG CCA TTA GGA CCA		1583
Ser Ala His Phe Val Thr Leu Asn Gly Ser Thr Val Pro Leu Gly Pro		
515	520	525
GCA AGT GAC ACA GGA ATT CTG AAT CCA GAT GGT TAT ACC CTC AAC TAC		1631
Ala Ser Asp Thr Gly Ile Leu Asn Pro Asp Gly Tyr Thr Leu Asn Tyr		
530	535	540
AAT GAA TAT ATT GTA TAT AAC CCC AAC CAG GTC CGT ATG CGG TAC CTT		1679
Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Pro Asn Gln Val Arg Met Arg Tyr Leu		
545	550	555
TTA AAG GTT CAG TTT AAT TTC CTT CAG CTG TGG TGA ATGTTGATAT		1725
Leu Lys Val Gln Phe Asn Phe Leu Gln Leu Trp *		
560	565	570
TAAATAAACC AGAGATCTGA TCTTCAAGCA AGAAAATAAG CAGTGTGTA CTTGTGAATT		1785
TTGTGATATT TTATGTAATA AAAACTGTAC AGGTCTAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA		1843

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 571 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg Ala			
1	5	10	15
Leu Asn Glu Ser Lys Arg Val Asn Asn Gly Asn Thr Ala Pro Glu Asp			
20	25	30	
Ser Ser Pro Ala Lys Lys Thr Arg Arg Cys Gln Arg Gln Glu Ser Lys			
35	40	45	
Lys Met Pro Val Ala Gly Gly Lys Ala Asn Lys Asp Arg Thr Glu Asp			
50	55	60	
Lys Gln Asp Glu Ser Val Lys Ala Leu Leu Leu Lys Gly Lys Ala Pro			
65	70	75	80
Val Asp Pro Glu Cys Thr Ala Lys Val Gly Lys Ala His Val Tyr Cys			
85	90	95	
Glu Gly Asn Asp Val Tyr Asp Val Met Leu Asn Gln Thr Asn Leu Gln			
100	105	110	
Phe Asn Asn Asn Lys Tyr Tyr Leu Ile Gln Leu Leu Glu Asp Asp Ala			
115	120	125	
Gln Arg Asn Phe Ser Val Trp Met Arg Trp Gly Arg Val Gly Lys Met			

130	135	140
Gly Gln His Ser Leu Val Ala Cys Ser Gly Asn Leu Asn Lys Ala Lys		
145	150	155
160		
Glu Ile Phe Gln Lys Lys Phe Leu Asp Lys Thr Lys Asn Asn Trp Glu		
165	170	175
Asp Arg Glu Lys Phe Glu Lys Val Pro Gly Lys Tyr Asp Met Leu Gln		
180	185	190
Met Asp Tyr Ala Thr Asn Thr Gln Asp Glu Glu Thr Lys Lys Glu		
195	200	205
Glu Ser Leu Lys Ser Pro Leu Lys Pro Glu Ser Gln Leu Asp Leu Arg		
210	215	220
Val Gln Glu Leu Ile Lys Leu Ile Cys Asn Val Gln Ala Met Glu Glu		
225	230	235
240		
Met Met Met Glu Met Lys Tyr Asn Thr Lys Lys Ala Pro Leu Gly Lys		
245	250	255
Leu Thr Val Ala Gln Ile Lys Ala Gly Tyr Gln Ser Leu Lys Lys Ile		
260	265	270
Glu Asp Cys Ile Arg Ala Gly Gln His Gly Arg Ala Leu Met Glu Ala		
275	280	285
Cys Asn Glu Phe Tyr Thr Arg Ile Pro His Asp Phe Gly Leu Arg Thr		
290	295	300
Pro Pro Leu Ile Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys Ile Gln Leu		
305	310	315
320		
Leu Glu Ala Leu Gly Asp Ile Glu Ile Ala Ile Lys Leu Val Lys Thr		
325	330	335
Glu Leu Gln Ser Pro Glu His Pro Leu Asp Gln His Tyr Arg Asn Leu		
340	345	350
His Cys Ala Leu Arg Pro Leu Asp His Glu Ser Tyr Glu Phe Lys Val		
355	360	365
Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Ser Thr His Ala Pro Thr His Ser Asp Tyr		
370	375	380
Thr Met Thr Leu Leu Asp Leu Phe Glu Val Glu Lys Asp Gly Glu Lys		
385	390	395
400		
Glu Ala Phe Arg Glu Asp Leu His Asn Arg Met Leu Leu Trp His Gly		
405	410	415
Ser Arg Met Ser Asn Trp Val Gly Ile Leu Ser His Gly Leu Arg Ile		
420	425	430
Ala Pro Pro Glu Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys Gly Ile		
435	440	445
Tyr Phe Ala Asp Met Ser Ser Lys Ser Ala Asn Tyr Cys Phe Ala Ser		

450	455	460
Arg Leu Lys Asn Thr Gly Leu Leu Leu Leu Ser Glu Val Ala Leu Gly		
465	470	475
Gln Cys Asn Glu Leu Leu Glu Ala Asn Pro Lys Ala Glu Gly Leu Leu		
485	490	495
Gln Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Met Ala Pro Ser Ser		
500	505	510
Ala His Phe Val Thr Leu Asn Gly Ser Thr Val Pro Leu Gly Pro Ala		
515	520	525
Ser Asp Thr Gly Ile Leu Asn Pro Asp Gly Tyr Thr Leu Asn Tyr Asn		
530	535	540
Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Pro Asn Gln Val Arg Met Arg Tyr Leu Leu		
545	550	555
Lys Val Gln Phe Asn Phe Leu Gln Leu Trp *		
565	570	

(2) ANGABEN ZU SEQ_ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2265 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (F) GEWEBETYP: Uterus

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 242..1843
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Poly ADP Ribose Polymerase"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ_ID NO: 3:

TGGGACTGGT CGCCTGACTC GGCCTGCCCC AGCCTCTGCT TCACCCCACT GGTGGCCAAA	60
TAGCCGATGT CTAATCCCCC ACACAAGCTC ATCCCCGGCC TCTGGGATTG TTGGGAATTC	120
TCTCCCTAAT TCACGCCTGA GGCTCATGGA GAGTTGCTAG ACCTGGGACT GCCCTGGGAG	180
GCGCACACAA CCAGGCCGGG TGGCAGCCAG GACCTCTCCC ATGTCCCTGC TTTTCTTGGC	240
C ATG GCT CCA AAG CCG AAG CCC TGG GTA CAG ACT GAG GGC CCT GAG	286
Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro Glu	

575	580	585	
AAG AAG AAG GGC CGG CAG GCA GGA AGG GAG GAG GAC CCC TTC CGC TCC Lys Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg Ser 590	595	600	334
ACC GCT GAG GCC CTC AAG GCC ATA CCC GCA GAG AAG CGC ATA ATC CGC Thr Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile Arg 605	610	615	382
GTC GAT CCA ACA TGT CCA CTC AGC AGC AAC CCC GGG ACC CAG GTG TAT Val Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val Tyr 620	625	630	430
GAG GAC TAC AAC TGC ACC CTG AAC CAG ACC AAC ATC GAG AAC AAC AAC Glu Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn Asn 635	640	645	478
AAC AAG TTC TAC ATC ATC CAG CTG CTC CAA GAC AGC AAC CGC TTC TTC Asn Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe Phe 655	660	665	526
ACC TGC TGG AAC CGC TGG GGC CGT GTG GGA GAG GTC GGC CAG TCA AAG Thr Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys 670	675	680	574
ATC AAC CAC TTC ACA AGG CTA GAA GAT GCA AAG AAG GAC TTT GAG AAG Ile Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu Lys 685	690	695	622
AAA TTT CGG GAA AAG ACC AAC AAC AAC TGG GCA GAG CGG GAC CAC TTT Lys Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His Phe 700	705	710	670
GTG TCT CAC CCG GGC AAG TAC ACA CTT ATC GAA GTA CAG GCA GAG GAT Val Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu Asp 715	720	725	718
GAG GCC CAG GAA GCT GTG GTG AAG GTG GAC AGA GGC CCA GTG AGG ACT Glu Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp Arg Gly Pro Val Arg Thr 735	740	745	766
GTG ACT AAG CGG GTG CAG CCC TGC TCC CTG GAC CCA GCC ACG CAG AAG Val Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Lys 750	755	760	814
CTC ATC ACT AAC ATC TTC AGC AAG GAG ATG TTC AAG AAC ACC ATG GCC Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Thr Met Ala 765	770	775	862
CTC ATG GAC CTG GAT GTG AAG AAG ATG CCC CTG GGA AAG CTG AGC AAG Leu Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser Lys 780	785	790	910
CAA CAG ATT GCA CGG GGT TTC GAG GGC TTG GAG GCG CTG GAG GAG GCC Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Ala 795	800	805	958
CTG AAA GGC CCC ACG GAT GGT GGC CAA AGC CTG GAG GAG CTG TCC TCA			1006

Leu Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser			
815	820	825	
CAC TTT TAC ACC GTC ATC CCG CAC AAC TTC GGC CAC AGC CAG CCC CCG		1054	
His Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly His Ser Gln Pro Pro			
830	835	840	
CCC ATC AAT TCC CCT GAG CTT CTG CAG GCC AAG AAG GAC ATG CTG CTG		1102	
Pro Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu			
845	850	855	
GTG CTG GCG GAC ATC GAG CTG GCC CAG GCC CTG CAG GCA GTC TCT GAG		1150	
Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala Leu Gln Ala Val Ser Glu			
860	865	870	
CAG GAG AAG ACG GTG GAG GAG GTG CCA CAC CCC CTG GAC CGA GAC TAC		1198	
Gln Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr			
875	880	885	890
CAG CTT CTC AAG TGC CAG CTG CAG CTG CTA GAC TCT GGA GCA CCT GAG		1246	
Gln Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Asp Ser Gly Ala Pro Glu			
895	900	905	
TAC AAG GTG ATA CAG ACC TAC TTA GAA CAG ACT GGC AGC AAC CAC AGG		1294	
Tyr Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln Thr Gly Ser Asn His Arg			
910	915	920	
TGC CCT ACA CTT CAA CAC ATC TGG AAA GTA AAC CAA GAA GGG GAG GAA		1342	
Cys Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val Asn Gln Glu Gly Glu Glu			
925	930	935	
GAC AGA TTC CAG GCC CAC TCC AAA CTG GGT AAT CGG AAG CTG CTG TGG		1390	
Asp Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Lys Leu Leu Trp			
940	945	950	
CAT GGC ACC AAC ATG GCC GTG GTG GCC GCC ATC CTC ACT AGT GGG CTC		1438	
His Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu			
955	960	965	970
CGC ATC ATG CCA CAT TCT GGT GGG CGT GTT GGC AAG GGC ATC TAC TTT		1486	
Arg Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe			
975	980	985	
GCC TCA GAG AAC AGC AAG TCA GCT GGA TAT GTT ATT GGC ATG AAG TGT		1534	
Ala Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Ile Gly Met Lys Cys			
990	995	1000	
GGG GCC CAC CAT GTC GGC TAC ATG TTC CTG GGT GAG GTG GCC CTG GGC		1582	
Gly Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly			
1005	1010	1015	
AGA GAG CAC CAT ATC AAC ACG GAC AAC CCC AGC TTG AAG AGC CCA CCT		1630	
Arg Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro			
1020	1025	1030	
CCT GGC TTC GAC AGT GTC ATT GCC CGA GGC CAC ACC GAG CCT GAT CCG		1678	
Pro Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp Pro			
1035	1040	1045	1050

ACC CAG GAC ACT GAG TTG GAG CTG GAT GGC CAG CAA GTG GTG GTG CCC	1726
Thr Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Val Pro	
1055 1060 1065	
CAG GGC CAG CCT GTG CCC TGC CCA GAG TTC AGC AGC TCC ACA TTC TCC	1774
Gln Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe Ser	
1070 1075 1080	
CAG AGC GAG TAC CTC ATC TAC CAG GAG AGC CAG TGT CGC CTG CGC TAC	1822
Gln Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr	
1085 1090 1095	
CTG CTG GAG GTC CAC CTC TGA GTGCCGCC TGTCGGGG GGTCTGCAA	1873
Leu Leu Glu Val His Leu *	
1100 1105	
GGCTGGACTG TGATCTCAA TCATCCTGCC CATCTCTGGT ACCCCTATAT CACTCCTTT	1933
TTTCAAGAAT ACAATACGTT GTTGTAACT ATAGTCACCA TGCTGTACAA GATCCCTGAA	1993
CTTATGCCCTC CTAAC TGAAA TTTGTATTG TTTGACACAT CTGCCAGTC CCTCTCCTCC	2053
CAGCCCATGG TAACCAGCAT TTGACTCTTT ACTTGTATAA GGGCAGCTTT TATAGGTTCC	2113
ACATGTAAGT GAGATCATGC AGTGTGTC TTTCTGTGCC TGGCTTATTT CACTCAGCAT	2173
AATGTGCACC GGGTCACCC ATGTTTCAT AAATGACAAG ATTCCTCCT TTAAAAAAA	2233
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA	2265

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 534 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro Glu Lys	
1 5 10 15	
Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg Ser Thr	
20 25 30	
Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile Arg Val	
35 40 45	
Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val Tyr Glu	
50 55 60	
Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn Asn Asn	
65 70 75 80	
Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe Phe Thr	
85 90 95	
Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Ile	

100	105	110
Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu Lys Lys		
115	120	125
Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His Phe Val		
130	135	140
Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu Asp Glu		
145	150	155
Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp Arg Gly Pro Val Arg Thr Val		
165	170	175
Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Lys Leu		
180	185	190
Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Thr Met Ala Leu		
195	200	205
Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser Lys Gln		
210	215	220
Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Ala Leu		
225	230	235
240		
Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser His		
245	250	255
Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly His Ser Gln Pro Pro Pro		
260	265	270
Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val		
275	280	285
Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala Leu Gln Ala Val Ser Glu Gln		
290	295	300
Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln		
305	310	315
320		
Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Ala Pro Glu Tyr		
325	330	335
Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln Thr Gly Ser Asn His Arg Cys		
340	345	350
Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val Asn Gln Glu Gly Glu Glu Asp		
355	360	365
Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Lys Leu Leu Trp His		
370	375	380
Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg		
385	390	395
400		
Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala		
405	410	415
Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Ile Gly Met Lys Cys Gly		

420

425

430

Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Arg
435 . 440 . 445

Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro
 450 455 460

Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp Pro Thr
465 470 475 480

Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Val Pro Gln
485 490 495

Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe Ser Gln
 500 505 . . . 510

Leu Glu Val His Leu *
530

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2265 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

(F) GEWEBETYP: Uterus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:221..1843
(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Poly ADP Ribose
Polymerase"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Leu Ala Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro			
540	545	550	555
GAG AAG AAG AAG GGC CGG CAG GCA GGA AGG GAG GAG GAC CCC TTC CGC			331
Glu Lys Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg			
560	565	570	
TCC ACC GCT GAG GCC CTC AAG GCC ATA CCC GCA GAG AAG CGC ATA ATC			379
Ser Thr Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile			
575	580	585	
CGC GTG GAT CCA ACA TGT CCA CTC AGC AGC AAC CCC GGG ACC CAG GTG			427
Arg Val Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val			
590	595	600	
TAT GAG GAC TAC AAC TGC ACC CTG AAC CAG ACC AAC ATC GAG AAC AAC			475
Tyr Glu Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn			
605	610	615	
AAC AAC AAG TTC TAC ATC ATC CAG CTG CTC CAA GAC AGC AAC CGC TTC			523
Asn Asn Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe			
620	625	630	635
TTC ACC TGC TGG AAC CGC TGG GGC CGT GTG GGA GAG GTC GGC CAG TCA			571
Phe Thr Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser			
640	645	650	
AAG ATC AAC CAC TTC ACA AGG CTA GAA GAT GCA AAG AAG GAC TTT GAG			619
Lys Ile Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu			
655	660	665	
AAG AAA TTT CGG GAA AAG ACC AAC AAG AAC TGG GCA GAG CGG GAC CAC			667
Lys Lys Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His			
670	675	680	
TTT GTG TCT CAC CCG GGC AAG TAC ACA CTT ATC GAA GTA CAG GCA GAG			715
Phe Val Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu			
685	690	695	
GAT GAG GCC CAG GAA GCT GTG GTG AAG GTG GAC AGA GGC CCA GTG AGG			763
Asp Glu Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp Arg Gly Pro Val Arg			
700	705	710	715
ACT GTG ACT AAG CGG GTG CAG CCC TGC TCC CTG GAC CCA GCC ACG CAG			811
Thr Val Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln			
720	725	730	
AAG CTC ATC ACT AAC ATC TTC AGC AAG GAG ATG TTC AAG AAC ACC ATG			859
Lys Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Thr Met			
735	740	745	
GCC CTC ATG GAC CTG GAT GTG AAG AAG ATG CCC CTG GGA AAG CTG AGC			907
Ala Leu Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser			
750	755	760	
AAG CAA CAG ATT GCA CGG GGT TTC GAG GCC TTG GAG GCG CTG GAG GAG			955
Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu			
765	770	775	

GCC CTG AAA GGC CCC ACG GAT GGT GGC CAA AGC CTG GAG GAG CTG TCC Ala Leu Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser 780 785 790 795	1003
TCA CAC TTT TAC ACC GTC ATC CCG CAC AAC TTC GGC CAC AGC CAG CCC Ser His Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly His Ser Gln Pro 800 805 810	1051
CCG CCC ATC AAT TCC CCT GAG CTT CTG CAG GCC AAG AAG GAC ATG CTG Pro Pro Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu 815 820 825	1099
CTG GTG CTG GCG GAC ATC GAG CTG GCC CAG GCC CTG CAG GCA GTC TCT Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala Leu Gln Ala Val Ser 830 835 840	1147
GAG CAG GAG AAG ACG GTG GAG GTG CCA CAC CCC CTG GAC CGA GAC Glu Gln Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp 845 850 855	1195
TAC CAG CTT CTC AAG TGC CAG CTG CAG CTG CTA GAC TCT GGA GCA CCT Tyr Gln Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Asp Ser Gly Ala Pro 860 865 870 875	1243
GAG TAC AAG GTG ATA CAG ACC TAC TTA GAA CAG ACT GGC AGC AAC CAC Glu Tyr Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln Thr Gly Ser Asn His 880 885 890	1291
AGG TGC CCT ACA CTT CAA CAC ATC TGG AAA GTA AAC CAA GAA GGG GAG Arg Cys Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val Asn Gln Glu Gly Glu 895 900 905	1339
GAA GAC AGA TTC CAG GCC CAC TCC AAA CTG GGT AAT CGG AAG CTG CTG Glu Asp Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Lys Leu Leu 910 915 920	1387
TGG CAT GGC ACC AAC ATG GCC GTG GTG GCC GCC ATC CTC ACT AGT GGG Trp His Gly Thr Asn Met Ala Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly 925 930 935	1435
CTC CGC ATC ATG CCA CAT TCT GGT GGG CGT GTT GGC AAG GGC ATC TAC Leu Arg Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr 940 945 950 955	1483
TTT GCC TCA GAG AAC AGC AAG TCA GCT GGA TAT GTT ATT GGC ATG AAG Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Ile Gly Met Lys 960 965 970	1531
TGT GGG GCC CAC CAT GTC GGC TAC ATG TTC CTG GGT GAG GTG GCC CTG Cys Gly Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu 975 980 985	1579
GGC AGA GAG CAC CAT ATC AAC ACG GAC AAC CCC AGC TTG AAG AGC CCA Gly Arg Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro 990 995 1000	1627
CCT CCT GGC TTC GAC AGT GTC ATT GCC CGA GGC CAC ACC GAG CCT GAT Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp	1675

1005	1010	1015	
CCG ACC CAG GAC ACT GAG TTG GAG CTG GAT GGC CAG CAA GTG GTG GTG			1723
Pro Thr Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Val			
1020	1025	1030	1035
CCC CAG GGC CAG CCT GTG CCC TGC CCA GAG TTC AGC AGC TCC ACA TTC			1771
Pro Gln Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe			
1040	1045	1050	
TCC CAG AGC GAG TAC CTC ATC TAC CAG GAG AGC CAG TGT CGC CTG CGC			1819
Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg			
1055	1060	1065	
TAC CTG CTG GAG GTC CAC CTC TGA GTGCCGGCC TGTCGGGG GGTCTGCAA			1873
Tyr Leu Leu Glu Val His Leu *			
1070	1075		
GGCTGGACTG TGATCTTCAA TCATCCTGCC CATCTCTGGT ACCCCTATAT CACTCCTTT			1933
TTTCAAGAAT ACAATACGTT GTTGTAACT ATAGTCACCA TGCTGTACAA GATCCCTGAA			1993
CTTATGCCCTC CTAAC TGAAA TTTGTATTG TTTGACACAT CTGCCAGTC CCTCTCCTCC			2053
CAGCCCATGG TAACCAGCAT TTGACTCTT ACTTGTATAA GGGCAGCTTT TATAGGTTCC			2113
ACATGTAAGT GAGATCATGC AGTGTGTC TTTCTGTGCC TGGCTTATT CACTCAGCAT			2173
AATGTGCACC GGGTTCACCC ATGTTTCAT AAATGACAAG ATTCCTCCT TTAAAAAAA			2233
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA			2265

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 541 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

) ART DES MOLEKÜLS: Protein

) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Ala	Met	Ala	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Trp	Val
1				5					10					15	
Gln	Thr	Glu	Gly	Pro	Glu	Lys	Lys	Lys	Gly	Arg	Gln	Ala	Gly	Arg	Glu
				20				25					30		
Glu	Asp	Pro	Phe	Arg	Ser	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Lys	Ala	Ile	Pro	Ala
				35				40					45		
Glu	Lys	Arg	Ile	Ile	Arg	Val	Asp	Pro	Thr	Cys	Pro	Leu	Ser	Ser	Asn
				50			55					60			
Pro	Gly	Thr	Gln	Val	Tyr	Glu	Asp	Tyr	Asn	Cys	Thr	Leu	Asn	Gln	Thr
				65			70			75				80	
Asn	Ile	Glu	Asn	Asn	Asn	Lys	Phe	Tyr	Ile	Ile	Gln	Leu	Leu	Gln	

85	90	95	
Asp Ser Asn Arg Phe Phe Thr Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly			
100	105	110	
Glu Val Gly Gln Ser Lys Ile Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala			
115	120	125	
Lys Lys Asp Phe Glu Lys Lys Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp			
130	135	140	
Ala Glu Arg Asp His Phe Val Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile			
145	150	155	160
Glu Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp			
165	170	175	
Arg Gly Pro Val Arg Thr Val Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu			
180	185	190	
Asp Pro Ala Thr Gln Lys Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met			
195	200	205	
Phe Lys Asn Thr Met Ala Leu Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro			
210	215	220	
Leu Gly Lys Leu Ser Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu			
225	230	235	240
Glu Ala Leu Glu Glu Ala Leu Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser			
245	250	255	
Leu Glu Glu Leu Ser Ser His Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe			
260	265	270	
Gly His Ser Gln Pro Pro Pro Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala			
275	280	285	
Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala			
290	295	300	
Leu Gln Ala Val Ser Glu Gln Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His			
305	310	315	320
Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Leu			
325	330	335	
Asp Ser Gly Ala Pro Glu Tyr Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln			
340	345	350	
Thr Gly Ser Asn His Arg Cys Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val			
355	360	365	
Asn Gln Glu Gly Glu Glu Asp Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly			
370	375	380	
Asn Arg Lys Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala			
385	390	395	400
Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val			

405	410	415
Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr		
420	425	430
Val Ile Gly Met Lys Cys Gly Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu		
435	440	445
Gly Glu Val Ala Leu Gly Arg Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro		
450	455	460
Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly		
465	470	475
His Thr Glu Pro Asp Pro Thr Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly		
485	490	495
Gln Gln Val Val Val Pro Gln Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe		
500	505	510
Ser Ser Ser Thr Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser		
515	520	525
Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Val His Leu *		
530	535	540

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1740 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: *Mus musculus*
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 112..1710

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CCCGGGCTTTC ACTTTTCTG CTGCCTCGGG GAAACACCTCG AGCCAACTGC TTCCTAACTC	60	
AGGGTGGGCA GAACTGACGG GATCTAAGCT TCTGCATCTC TGAGGAGAAC C ATG GCT	117	
Met Ala		
CCA AAA CGA AAG GCC TCT GTG CAG ACT GAG GGC TCC AAG AAG CAG CGA	165	
Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys Gln Arg		
545	550	555

CAA GGG ACA GAG GAG GAC AGC TTC CGG TCC ACT GCC GAG GCT CTC Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu Ala Leu 560 565 570 575	213
AGA GCA GCA CCT GCT GAT AAT CGG GTC ATC CGT GTG GAC CCC TCA TGT Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro Ser Cys 580 585 590	261
CCA TTC AGC CGG AAC CCC GGG ATA CAG GTC CAC GAG GAC TAT GAC TGT Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr Asp Cys 595 600 605	309
ACC CTG AAC CAG ACC AAC ATC GGC AAC AAC AAC AAG TTC TAT ATT Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Lys Phe Tyr Ile 610 615 620	357
ATC CAA CTG CTG GAG GAG GGT AGT CGC TTC TTC TGC TGG AAT CGC TGG Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn Arg Trp 625 630 635	405
GGC CGC GTG GGA GAG GTG GGC CAG AGC AAG ATG AAC CAC TTC ACC TGC Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe Thr Cys 640 645 650 655	453
CTG GAA GAT GCA AAG AAG GAC TTT AAG AAG AAA TTT TGG GAG AAG ACT Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Phe Trp Glu Lys Thr 660 665 670	501
AAA AAC AAA TGG GAG GAG CGG GAC CGT TTT GTG GCC CAG CCC AAC AAG Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro Asn Lys 675 680 685	549
TAC ACA CTT ATA GAA GTC CAG GGA GAA GCA GAG AGC CAA GAG GCT GTA Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu Ala Val 690 695 700	597
GTG AAG GCC TTA TCT CCC CAG GTG GAC AGC GGC CCT GTG AGG ACC GTG Val Lys Ala Leu Ser Pro Gln Val Asp Ser Gly Pro Val Arg Thr Val 705 710 715	645
GTC AAG CCC TGC TCC CTA GAC CCT GCC ACC CAG AAC CTT ATC ACC AAC Val Lys Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile Thr Asn 720 725 730 735	693
ATC TTC AGC AAA GAG ATG TTC AAG AAC GCA ATG ACC CTC ATG AAC CTG Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met Asn Leu 740 745 750	741
GAT GTG AAG AAG ATG CCC TTG GGA AAG CTG ACC AAG CAG CAG ATT GCC Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln Ile Ala 755 760 765	789
CGT GGC TTC GAG GCC TTG GAA GCT CTA GAG GAG GCC ATG AAA AAC CCC Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Ala Met Lys Asn Pro 770 775 780	837
ACA GGG GAT GGC CAG AGC CTG GAA GAG CTC TCC TCC TGC TTC TAC ACT Thr Gly Asp Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr	885

785	790	795	
GTC ATC CCA CAC AAC TTC GGC CGC AGC CGA CCC CCG CCC ATC AAC TCC Val Ile Pro His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile Asn Ser 800 805 810 815			933
CCT GAT GTG CTT CAG GCC AAG AAG GAC ATG CTG CTG GTG CTA GCG GAC Pro Asp Val Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp 820 825 830			981
ATC GAG TTG GCG CAG ACC TTG CAG GCA GCC CCT GGG GAG GAG GAG GAG Ile Glu Leu Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu 835 840 845			1029
AAA GTG GAA GAG GTG CCA CAC CCA CTG GAT CGA GAC TAC CAG CTC CTC Lys Val-Glu Glu Val Pro-His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu 850 855 860			1077
AGG TGC CAG CTT CAA CTG CTG GAC TCC GGG GAG TCC GAG TAC AAG GCA Arg Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala 865 870 875			1125
ATA CAG ACC TAC CTG AAA CAG ACT GGC AAC AGC TAC AGG TGC CCA AAC Ile Gln Thr Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn 880 885 890 895			1173
CTG CGG CAT GTT TGG AAA GTG AAC CGA GAA GGG GAG GGA GAC AGG TTC Leu Arg His Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe 900 905 910			1221
CAG GCC CAC TCC AAA CTG GGC AAT CGG AGG CTG CTG TGG CAC GGC ACC Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr 915 920 925			1269
AAT GTG GCC GTG GTG GCT GCC ATC CTC ACC AGT GGG CTC CGA ATC ATG Asn Val Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met 930 935 940			1317
CCA CAC TCG GGT GGT CGT GTT GGC AAG GGT ATT TAT TTT GCC TCT GAG Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu 945 950 955			1365
AAC AGC AAG TCA GCT GGC TAT GTT ACC ACC ATG CAC TGT GGG GGC CAC Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly His 960 965 970 975			1413
CAG GTG GGC TAC ATG TTC CTG GGC GAG GTG GCC CTC GGC AAA GAG CAC Gln Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His 980 985 990			1461
CAC ATC ACC ATC GAT GAC CCC AGC TTG AAG AGT CCA CCC CCT GGC TTT His Ile Thr Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Gly Phe 995 1000 1005			1509
GAC AGC GTC ATC GCC CGA GGC CAA ACC GAG CCG GAT CCC GCC CAG GAC Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp 1010 1015 1020			1557
ATT GAA CTT GAA CTG GAT GGG CAG CCG GTG GTG GTG CCC CAA GGC CCG			1605

Ile Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro			
1025	1030	1035	
CCT GTG CAG TGC CCG TCA TTC AAA AGC TCC AGC TTC AGC CAG AGT GAA			1653
Pro Val Gln Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu			
1040	1045	1050	1055
TAC CTC ATA TAC AAG GAG AGC CAG TGT CGC CTG CGC TAC CTG CTG GAG			1701
Tyr Leu Ile Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu			
1060	1065	1070	
ATT CAC CTC TAAGCTGCTT GCCCTCCCTA GGTCCAAGCC			1740
Ile His Leu			

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 533 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys			
1	5	10	15

Gln Arg Gln Gly Thr Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu		
20	25	30

Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro		
35	40	45

Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr		
50	55	60

Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Lys Phe			
65	70	75	80

Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn		
85	90	95

Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe		
100	105	110

Thr Cys Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Phe Trp Glu		
115	120	125

Lys Thr Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro		
130	135	140

Asn Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu			
145	150	155	160

Ala Val Val Lys Ala Leu Ser Pro Gln Val Asp Ser Gly Pro Val Arg		
165	170	175

Thr Val Val Lys Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile		
---	--	--

180

185

190

Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met
 195 200 205

Asn Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln
 210 215 220

Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Ala Met Lys
 225 230 235 240

Asn Pro Thr Gly Asp Gly Gln Ser Leu Glu Leu Ser Ser Cys Phe
 245 250 255

Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile
 260 265 270

Asn Ser Pro Asp Val Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu
 275 280 285

Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu
 290 295 300

Glu Glu Lys Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln
 305 310 315 320

Leu Leu Arg Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr
 325 330 335

Lys Ala Ile Gln Thr Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys
 340 345 350

Pro Asn Leu Arg His Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp
 355 360 365

Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His
 370 375 380

Gly Thr Asn Val Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg
 385 390 395 400

Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala
 405 410 415

Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly
 420 425 430

Gly His Gln Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys
 435 440 445

Glu His His Ile Thr Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro
 450 455 460

Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala
 465 470 475 480

Gln Asp Ile Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln
 485 490 495

Gly Pro Pro Val Gln Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln

500 505 510

Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu
515 . 520 525

Leu Glu Ile His Leu
530

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1587 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- iv) ANTISENSE: NEIN
- vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: *Mus musculus*
- ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 1..1584

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

ATG GCT CCA AAA CGA AAG GCC TCT GTG CAG ACT GAG GGC TCC AAG AAG	48
Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys	
535 540 545	
CAG CGA CAA GGG ACA GAG GAG GAG GAC AGC TTC CGG TCC ACT GCC GAG	96
Gln Arg Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu	
550 555 560 565	
GCT CTC AGA GCA GCA CCT GCT GAT AAT CGG GTC ATC CGT GTG GAC CCC	144
Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro	
570 575 580	
TCA TGT CCA TTC AGC CGG AAC CCC GGG ATA CAG GTC CAC GAG GAC TAT	192
Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr	
585 590 595	
GAC TGT ACC CTG AAC CAG ACC AAC ATC GGC AAC AAC AAC AAC AAG TTC	240
Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe	
600 605 610	
TAT ATT ATC CAA CTG CTG GAG GAG GGT AGT CGC TTC TTC TGC TGG AAT	288
Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn	
615 620 625	
CGC TGG GGC CGC GTG GGA GAG GTG GGC CAG AGC AAG ATG AAC CAC TTC	336
Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe	
630 635 640 645	

ACC TGC CTG GAA GAT GCA AAG AAG GAC TTT AAG AAG AAA TTT TGG GAG Thr Cys Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Phe Trp Glu 650 655 660	384
AAG ACT AAA AAC AAA TGG GAG GAG CGG GAC CGT TTT GTG GCC CAG CCC Lys Thr Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro 665 670 675	432
AAC AAG TAC ACA CTT ATA GAA GTC CAG GGA GAA GCA GAG AGC CAA GAG Asn Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu 680 685 690	480
GCT GTA GTG AAG GTG GAC AGC GGC CCT GTG AGG ACC GTG GTC AAG CCC Ala Val Val Lys Val Asp Ser Gly Pro Val Arg Thr Val Val Lys Pro 695 700 705	528
TGC TCC CTA GAC CCT GCC ACC CAG AAC CTT ATC ACC AAC ATC TTC AGC Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser 710 715 720 725	576
AAA GAG ATG TTC AAG AAC GCA ATG ACC CTC ATG AAC CTG GAT GTG AAG Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met Asn Leu Asp Val Lys 730 735 740	624
AAG ATG CCC TTG GGA AAG CTG ACC AAG CAG CAG ATT GCC CGT GGC TTC Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe 745 750 755	672
GAG GCC TTG GAA GCT CTA GAG GAG GCC ATG AAA AAC CCC ACA GGG GAT Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Ala Met Lys Asn Pro Thr Gly Asp 760 765 770	720
GGC CAG AGC CTG GAA GAG CTC TCC TCC TGC TTC TAC ACT GTC ATC CCA Gly Gln Ser Leu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr Val Ile Pro 775 780 785	768
CAC AAC TTC GGC CGC AGC CGA CCC CCG CCC ATC AAC TCC CCT GAT GTG His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile Asn Ser Pro Asp Val 790 795 800 805	816
CTT CAG GCC AAG AAG GAC ATG CTG CTG GTG CTA GCG GAC ATC GAG TTG Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu 810 815 820	864
GCG CAG ACC TTG CAG GCA GCC CCT GGG GAG GAG GAG GAG AAA GTG GAA Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu Lys Val Glu 825 830 835	912
GAG GTG CCA CAC CCA CTG GAT CGA GAC TAC CAG CTC CTC AGG TGC CAG Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu Arg Cys Gln 840 845 850	960
CTT CAA CTG CTG GAC TCC GGG GAG TCC GAG TAC AAG GCA ATA CAG ACC Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala Ile Gln Thr 855 860 865	1008
TAC CTG AAA CAG ACT GGC AAC AGC TAC AGG TGC CCA AAC CTG CGG CAT Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn Leu Arg His	1056

870	875	880	885	
GTT TGG AAA GTG AAC CGA GAA GGG GAG GGA GAC AGG TTC CAG GCC CAC Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe Gln Ala His 890	895	895	900	1104
TCC AAA CTG GGC AAT CGG AGG CTG CTG TGG CAC GGC ACC AAT GTG GCC Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Val Ala 905	910		915	1152
GTC GTG GCT GCC ATC CTC ACC AGT GGG CTC CGA ATC ATG CCA CAC TCG Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser 920	925		930	1200
GGT GGT CGT GTT GGC AAG GGT ATT TAT TTT GCC TCT GAG AAC AGC AAG Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys 935	940		945	1248
TCA GCT GGC TAT GTT ACC ACC ATG CAC TGT GGG GGC CAC CAG GTG GGC Ser Ala Gly Tyr Val Thr Met His Cys Gly Gly His Gln Val Gly 950	955		960	965
TAC ATG TTC CTG GGC GAG GTG GCC CTC GGC AAA GAG CAC CAC ATC ACC Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His His Ile Thr 970	975		980	1344
ATC GAT GAC CCC AGC TTG AAG AGT CCA CCC CCT GGC TTT GAC AGC GTC Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val 985	990		995	1392
ATC GCC CGA GGC CAA ACC GAG CCG GAT CCC GCC CAG GAC ATT GAA CTT Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp Ile Glu Leu 1000	1005		1010	1440
GAA CTG GAT GGG CAG CCG GTG GTG GTG CCC CAA GGC CCG CCT GTG CAG Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro Pro Val Gln 1015	1020		1025	1488
TGC CCG TCA TTC AAA AGC TCC AGC TTC AGC CAG AGT GAA TAC CTC ATA Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile 1030	1035		1040	1045
TAC AAG GAG AGC CAG TGT CGC CTG CGC TAC CTG CTG GAG ATT CAC CTC Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Ile His Leu 1050	1055		1060	1584
TAA				1587

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 528 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys

1	5	10	15
Gln Arg Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu			
20	25	30	
Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro			
35	40	45	
Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr			
50	55	60	
Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Lys Phe			
65	70	75	80
Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn			
85	90	95	
Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe			
100	105	110	
Thr Cys Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Phe Trp Glu			
115	120	125	
Lys Thr Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro			
130	135	140	
Asn Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu			
145	150	155	160
Ala Val Val Lys Val Asp Ser Gly Pro Val Arg Thr Val Val Lys Pro			
165	170	175	
Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser			
180	185	190	
Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met Asn Leu Asp Val Lys			
195	200	205	
Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe			
210	215	220	
Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Met Lys Asn Pro Thr Gly Asp			
225	230	235	240
Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr Val Ile Pro			
245	250	255	
His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile Asn Ser Pro Asp Val			
260	265	270	
Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu			
275	280	285	
Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu Lys Val Glu			
290	295	300	
Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu Arg Cys Gln			
305	310	315	320
Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala Ile Gln Thr			

325	330	335
Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn Leu Arg His		
340	345	350
Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe Gln Ala His		
355	360	365
Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Val Ala		
370	375	380
Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser		
385	390	395
Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys		
405	410	415
Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His Gln Val Gly		
420	425	430
Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His His Ile Thr		
435	440	445
Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val		
450	455	460
Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp Ile Glu Leu		
465	470	475
Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro Pro Val Gln		
485	490	495
Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile		
500	505	510
Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Ile His Leu		
515	520	525

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE: 2
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Xaa steht fuer 1 bis 5 andere Aminosaeuren"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE:3
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer Ser oder Thr"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE:1
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer Ser oder Thr"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE:6
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer Ile oder Val"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE:9
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer 1 bis 5 andere Aminosäuren"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE:10
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer Ser oder Thr"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Xaa Xaa Gly Leu Arg Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Lys
1 5 10 15
Gly Ile Tyr Phe Ala
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 45 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE: 16
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer Ser oder Thr"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE: 21
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer Ile oder Val"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE: 24
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer 1 bis 5 andere Aminosaeuren"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE: 25
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer Ser oder Thr"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE: 6
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer Ser oder Thr"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Leu Leu Trp His Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Leu Xaa
1 5 10 15

Xaa Gly Leu Arg Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Lys Gly
20 25 30

Ile Tyr Phe Ala Xaa Xaa Ser Lys Ser Ala Xaa Tyr
35 40 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 22 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE:1
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer Leu oder Val"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 27 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE:21
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer Asp oder Glu"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE:22
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer 10 oder 11 andere Aminosäuren"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa
1 5 10 15

Gln Leu Leu Xaa Xaa Xaa Trp Gly Arg Val Gly
20 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Ala Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Thr Xaa Asn Xaa
1 5 10 15

Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Lys
20 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 44 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
- (B) LAGE: 4
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer Ile oder
Leu"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Gln Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Leu Gly Lys Leu
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Gln Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu
35 40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Phe Tyr Thr Xaa Ile Pro His Xaa Phe Gly Xaa Xaa Xaa Pro Pro
1 5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 17 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Leu Xaa Asp Ile Glu Xaa Ala Xaa Xaa
1 5 10 15

Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

Gly Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Glu Val Ala Leu Gly
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
(B) LAGE:14
(D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer 7 bis 9
andere Aminosaeuren"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Gly Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Leu Xaa
1 5 10 15

Gly Xaa Xaa Val
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Region
(B) LAGE:2
(D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa steht fuer Tyr oder
Phe"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Glu Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Leu Leu
 1 5 . 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

Met Ala Ala Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg Ala
 1 5 10 15

Leu Asn Glu Ser

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

Lys	Thr	Glu	Leu	Gln	Ser	Pro	Glu	His	Pro	Leu	Asp	Gln	His	Tyr	Arg
1														15	
Asn Leu His Cys															
20															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

Cys	Lys	Gly	Arg	Gln	Ala	Gly	Arg	Glu	Glu	Asp	Pro	Phe	Arg	Ser	Thr
1														15	
Ala Glu Ala Leu Lys															
20															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

Cys Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Leu Lys
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu
1 5 10 15
Ala Leu Lys

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

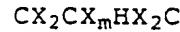
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu
1 5 10 15
Ala Met Lys

Patentansprüche

1. Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)-Homologes, gekennzeichnet
5 durch eine Aminosäuresequenz, welche
a) eine funktionale NAD⁺-Bindungsdomäne und
b) kein Zink-Finger-Sequenzmotiv der allgemeinen Formel



10 aufweist, worin
m für einen ganzzahligen Wert von 28 oder 30 steht und
die Reste X unabhängig voneinander für eine beliebige
Aminosäure stehen;
15 und die funktionalen Äquivalente davon.

2. PARP-Homologes nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
die funktionale NAD⁺-Bindungsdomäne eines der folgenden all-
gemeinen Sequenzmotive umfaßt:

20 $PX_n(S/T)GX_3GKGIYFA$,
 $(S/T)XGLR(I/V)XPX_n(S/T)GX_3GKGIYFA$ oder
 $LLWHG(S/T)X_7IL(S/T)XGLR(I/V)XPX_n(S/T)GX_3GKGIYFAX_3SKSAXY$

25 worin
n für einen ganzzahligen Wert von 1 bis 5 steht und die Reste
X unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure ste-
hen.

30 3. PARP-Homologes nach einem der vorherigen Ansprüche, umfassend
wenigstens ein weiteres der folgenden Teilsequenz-Motive:

35 $LX_9NX_2YX_2QLLX(D/E)X_{10/11}WGRVG$,
 $AX_3FXXX_4KTXNXWX_5FX_3PXX$,
 $QXL(I/L)X_2IX_9MX_{10}PLGKLX_3QIX_6L$,
 $FYTXIPHXFGX_3PP$; und
 $KX_3LX_2LXDIEXAX_2L$,

40 worin die Reste X unabhängig voneinander für eine beliebige
Aminosäure stehen.

4. PARP-Homologes nach einem der vorherigen Ansprüche, ausge-
wählt unter humanen PARP-Homologen, gekennzeichnet durch die
Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 (humanPARP2) oder SEQ ID
45 NO:4 oder 6 (humanPARP3 Typ 1 bzw. 2); oder murinen PARP-Ho-
mologen, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz gemäß SEQ

ID NO:8 (mausPARP Langform) oder SEQ ID NO:10 (mausPARP Kurzform); und die funktionalen Äquivalente davon.

5. Bindungspartner für PARP-Homologe nach einem der vorherigen Ansprüche, ausgewählt unter
 - a) Antikörpern und Fragmenten davon,
 - b) proteinartigen Verbindungen, welche mit einer Teilsequenz des Proteins wechselwirken, und
 - c) niedermolekularen Effektoren, welche die katalytische PARP-Aktivität oder eine andere biologische Funktion eines PARP-Moleküls modulieren.
10. Nukleinsäure, umfassend
 - a) eine für wenigstens ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodierende Nukleotidsequenz oder die komplementäre Nukleotidsequenz davon;
 - b) eine Nukleotidessequenz, die unter stringenten Bedingungen mit einer Sequenz gemäß a) hybridisiert; oder
 - c) Nukleotidsequenzen, die durch Entartung des genetischen Codes von den in a) und b) definierten Nukleotidsequenzen abgeleitet sind.
15. Nukleinsäure nach Anspruch 6, umfassend
 - a) die Nukleotide + 3 bis + 1715 gemäß SEQ ID NO:1;
 - b) die Nukleotide + 242 bis + 1843 gemäß SEQ ID NO:3;
 - c) die Nukleotide + 221 bis + 1843 gemäß SEQ ID NO:5;
 - d) die Nukleotide + 112 bis + 1710 gemäß SEQ ID NO:7; oder
 - e) die Nukleotide + 1 bis + 1584 gemäß SEQ ID NO:9.
20. Expressionskassette, enthaltend unter genetischer Kontrolle wenigstens einer regulativen Nukleotidsequenz wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß einem der Ansprüche 6 und 7.
25. Rekombinanter Vektor, umfassend wenigstens eine Expressionskassette nach Anspruch 8.
30. Rekombinanter Mikroorganismus, enthaltend wenigstens einen rekombinanten Vektor nach Anspruch 9.
35. Transgener Säuger, enthaltend einen Vektor gemäß Anspruch 9.

12. PARP-defizienter Säuger oder PARP-defiziente eukaryontische zelle, worin eine funktionale Expression wenigstens eines Gens inhibiert ist, das für ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodiert.

5

13. In vitro Nachweisverfahren für PARP-Inhibitoren dadurch gekennzeichnet, daß man

10 a) ein ungeträgertes oder geträgertes Poly-ADP-ribosylierbares Target mit einem Reaktionsgemisch inkubiert, umfassend

15 a1) ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4;

a2) einen PARP-Aktivator; und

a3) einen PARP-Inhibitor oder einen Analyten, in welchem man wenigstens einen PARP-Inhibitor vermutet;

b) die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durchführt; und

c) die Poly-ADP-Ribosylierung des Target qualitativ oder quantitativ bestimmt.

20 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass man das PARP-Homologe mit dem PARP-Aktivator und dem PARP-Inhibitor oder einen Analyten, in welchem man wenigstens einen PARP-Inhibitor vermutet, vorinkubiert, bevor man die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durchführt.

25

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 und 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Poly-ADP-ribosylierbare Target ein Histon-Protein ist.

30 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der PARP-Aktivator aktivierte DNA ist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass man die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durch 35 Zugabe von NAD⁺ startet.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass man die Poly-ADP-Ribosylierung des geträgerten Target mit Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper bestimmt.

40

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das nichtgeträgerte Target mit einem Akzeptor-Fluorophor markiert ist.

45 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man die Poly-ADP-Ribosylierung des nicht geträgerten Target mit Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper bestimmt, der mit einem Do-

nor-Fluorophor markiert ist, das zur Energieübertragung auf das Akzeptor-Fluorophor befähigt ist.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 und 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Target biotinyliertes Histon ist und das Akzeptor-Fluorophor über Avidin oder Streptavidin daran gekoppelt ist.
5
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 und 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper ein Europium-Kryptat als Donor-Fluorophor trägt.
10
23. In vitro-Screeningverfahren auf Bindungspartner für ein PARP-Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß man
15 a1) wenigstens ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4 an einem Träger immobilisiert;
b1) das immobilisierte PARP-Homologe mit einem Analyten in Kontakt bringt, in welchem man wenigstens einen Bindungspartner vermutet; und
20 c1) an das immobilisierte PARP-Homologe gebundene Bestandteile des Analyten, gegebenenfalls nach einer Inkubationsphase, bestimmt;

oder
25

- a2) einen Analyten, welcher wenigstens einen möglichen Bindungspartner für ein PARP-Molekül enthält, an einem Träger immobilisiert;
- b2) den immobilisierten Analyten mit wenigstens einem PARP-Homologen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in Kontakt bringt, für welches man einen Bindungspartner sucht; und
30 c2) den immobilisierten Analyten, gegebenenfalls nach einer Inkubationsphase, auf die Bindung des PARP-Homologen untersucht.

35

24. Verfahren zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung von PARP-Homologe nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodierenden Nukleinsäuren, gekennzeichnet durch
40 a) Inkubation einer biologischen Probe mit einer definierten Menge einer exogenen Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6 und 7, Hybridisierung unter stringenten Bedingungen, Bestimmung der hybridisierenden Nukleinsäuren und gegebenenfalls Vergleich mit einem Standard; oder
b) Inkubation einer biologischen Probe mit einem Paar von Oligonucleotid-Primern mit Spezifität für ein PARP-Homologe kodierende Nukleinsäure, Amplifizierung der Nu-
45

kleinsäure, Bestimmung des Amplifikationsprodukts und gegebenenfalls Vergleich mit einem Standard.

25. Verfahren zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung eines PARP-Homologen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch
 - 5 a) Inkubation einer biologischen Probe mit einem für ein PARP-Homologes spezifischen Bindungspartner,
 - b) Nachweis des Bindungspartner/PARP-Komplexes und gegebenenfalls
 - 10 c) Vergleich des Ergebnisses mit einem Standard.
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Bindungspartner ein Antikörper oder ein bindendes Fragment davon ist, der gegebenenfalls eine detektierbare Markierung 15 trägt.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26 zur Diagnostizierung von Energiedefizienz-vermittelten Erkrankungen.
- 20 28. Verfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit vom PARP-Effektoren, dadurch gekennzeichnet daß man
 - 25 a) ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4 mit einem Analyten inkubiert, welcher einen Effektor einer physiologischen oder pathologischen PARP-Aktivität enthält; den Effektor gegebenenfalls wieder abtrennt; und
 - b) die Aktivität des PARP-Homologen, gegebenenfalls nach Zugebung von Substraten oder Cosubstraten, bestimmt.
- 30 29. Gentherapeutisches Mittel, dadurch gekennzeichnet, das es in einem gentherapeutisch akzeptablen Träger ein Nukleinsäurekonstrukt enthält, das
 - 35 a) eine Antisense-Nukleinsäure gegen eine kodierende Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6 und 7; oder
 - b) ein Ribozym gegen eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6 und 7 umfasst; oder
 - c) für einen spezifischen PARP-Inhibitor.
- 40 30. Pharmazeutisches Mittel, enthaltend in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger wenigstens ein PARP-Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wenigstens einen PARP-Bindungspartner nach Anspruch 5 oder wenigstens eine kodierende Nukleotidsequenz nach Anspruch 6 oder 7.

87

31. Verwendung niedermolekularer PARP-Bindungspartner nach Anspruch 5 zur Diagnose oder Therapie von Krankheitszuständen, an deren Entstehung und/oder Verlauf wenigstens ein PARP-Protein oder ein davon abgeleitetes Polypeptid beteiligt ist.

5

32. Verwendung niedermolekularer PARP-Bindungspartner nach Anspruch 5 zur Diagnose oder Therapie von Krankheitszuständen, die durch eine Energiedefizienz vermittelt sind.

10

15

20

25

30

35

40

45

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 / 7

<p>10</p> <p>H A E S S D K L Y R V E Y A K S E R A S C K K C S E S I P K D S L R M A I N V Q S P H F D G K V P H P S C F N K V</p> <p>H A A R</p> <p>H S</p> <p>H</p>	<p>20</p> <p>10</p> <p>40</p> <p>50</p> <p>60</p>	<p>Majority</p>
<p>61</p> <p>G H S I R H P D V E Y D G F S E L R W D D Q Q K V K K T A E A G O V T G R Q Q D G I O S K A E K T L O D F A N E Y A K S</p> <p>R R S T Q Q G R A</p> <p>J</p> <p>2</p>	<p>70</p> <p>80</p> <p>90</p> <p>100</p> <p>110</p> <p>120</p>	<p>Majority</p>
<p>110</p> <p>H R S T C K G C H E K I E K G Q V R L S K K M V D P E K P Q L G H I D R M Y H P Q C P V K H R E E L G P R P E Y S A S Q</p> <p>S K H V H N G H T A P E D D S S P A K K T R R</p> <p>J</p> <p>2</p>	<p>140</p> <p>150</p> <p>160</p> <p>170</p> <p>180</p>	<p>Majority</p>
<p>190</p> <p>L K O F S L L A T E D K E A L K K Q L P Q V K S E G K N K Q D K V D Q V D E V A K K K S K K E K D K D S K L E K A L K A</p> <p>O R O E S K K N P V A Q Q K A H K D T F D K Q D</p> <p>J</p> <p>2</p>	<p>200</p> <p>210</p> <p>220</p> <p>230</p> <p>240</p>	<p>Majority</p>
<p>250</p> <p>Q H D L I W N I K D E L K K V C S T N D L K E L L I P N K Q Q V P S Q E S A I L D R V A D Q H V F G A L L P C E E C S G</p> <p>E S V K A L L L K G K A P V D P</p> <p>68</p> <p>J</p> <p>2</p>	<p>260</p> <p>270</p> <p>280</p> <p>290</p> <p>300</p>	<p>Majority</p>

529 Rec'd PCT/PTC 30 NOV 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

217

Fig. 1(2)

529 Rec'd PCT/PTC 30 NOV 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

L H I F T X - L E D A K E D F X K K F X E K T K H N N W E E R D X F V K X P O K Y T T L E V D Y - x x x E D E A V V K - Majority

610 - S L X V D X G P V S T V V K R V Q P C S L D P A T Q X L I T H I F S V E M P K H A H X U N X L D V K K M P I G K L S K Majority

620 610 630 640 650 660

601 L E Q H P S K - E D A I E H F H K L Y E E K T G N A W H S K N - F T K Y P K K P Y P L E I D Y G - - Q D E E A V V K K - humanPARP1

149 L V A C S G H L N K A K E I P Q K K F L D K T K H M W E D R E K P F E K V P O K Y T D M L Q H D Y A T N T Q D E E E T K K - humanPARP2

119 I N H P T R - L E D A K K O P E K K F R E K T K H M W A P R D H P V S H N P O K Y T L I E V O - - A E D E A Q E A V V K K - humanPARP3

109 H H I F T C - L E D A K K D P K K K F W E K T K H M W E E R D H V A Q P H K Y T L I E V O - - G E A E S Q E A V V K K - murinePARP

655 - L T V N P G C T K S K I . P K P V O - - - - - D L I K H I P D O V E S H K K A H V E Y E I D L Q K H P L G K L S K humanPARP1

209 E S L K S P L K P E S Q L D L R V Q - - - - - E L I K L I C H N U Q A H E E W H M K Y N T K K A P L G K L T V humanPARP2

175 - - - V D R G P V R T V T K R V Q P C S L D P A T O K L I T H I F S K E M P K H M T H A L H D D U D V K K H P L G K L S K humanPARP3

166 L S P Q V D S G C P V R T V V K - - - P C S L D P A T Q N L I T H I F S K E M F K H M T L H H L D V K K H P L G K L T K murinePARP

700 690 700 710 720

710 700 750 760 770 780

704 R O I Q A A Y S I I L S E V Q Q A V S Q O S S D S Q I L D - L S N R F Y T L I P H D P G H K K P P L L N H A D S V Q A K V humanPARP1

260 A O I K A Q Y O S L K K I E D C I R A G C O N G R A U H E - A C H E F Y T R I P H D P G L R T P P L I R T Q K E L S E K I humanPARP2

221 O O I A R G F E A L K G P T D C O O S L E E L S S H P V T V I P H N P O H S Q P P I N S P E L L L Q A K K humanPARP3

723 Q Q I A R G F E A L E A L E E A N K H P T G D G Q S L E E L S S C F Y T V I P H N F G R S R P P I N S P D V L Q A K K murinePARP

790 780 800 810 820 830 840

850 860 870 880 890 900

761 E H L D U N I L D I E V A N S L L R G O S D D S K - - - - D P I D V H Y E K L K T D I K V V D R D S E E A E I I R K Y humanPARP1

119 Q L L E A L G D I E L A I K J L V K T B Q - S P E - - - - D Q H Y R H L H C A L R P L D H E S Y E F R V I S O Y humanPARP2

291 D H L L U V L A D I E L A Q A L O A V 9 - E Q E K T V E E V P H P L D R D Y Q L K C Q L Q L D S O A P E Y K V I O T Y humanPARP3

283 D H L L C V L A D I E L A Q A T L Q A P G E E E K V E E V P H P L D R D Y Q L R C Q L Q L D S O E S E Y K A I Q T Y murinePARP

818 V K N T H A T H A Y D L E V I D I F K I E R E G E C Q R Y K P P K Q L H H R R L W H G S R T T H F A Q I L S Q O L humanPARP1

171 L O S T H A P T H S O N T H T U L D I P E V E K D G E R E K A P R - - E D L H H R H M S I W V Q I L S H G L humanPARP2

150 L E O T O S N H R C P - - T L Q H V W K V N Q E O E E D R P Q A H S K L O N R K L L W H G T H H A V V A I L T S Q L humanPARP3

141 L K O T G N S Y n C P - - N L R H V W K V N R E C E G D R P O A H S K L O N R K L L W H G T N V A V V A I L T S Q L murinePARP

529 Rec'd PCT/PTC 30 NOV 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RIAPHEAP - SGGRVQKQIYFASBNSSKSAQYVXTSGXCOGHXVOLHLLQEVATQXEHXLXXA Majority

910 920 930 940 950 960

878 R I A P P E A P V T G Y H P G K Q I Y P A D H V S K S A H Y C T S Q - G D P I O L I L L G E V A L O N H Y E L K H A humanPARP1
411 R I A P P E A P I T O Y H F G K Q I Y P A D H S S K S A H Y C P A S R - L K N T O L I L L S E V A L O C N E L E A humanPARP2
407 R I H P I - - - S G G R V G K Q I Y P A S B N S K S A G Y V I G H K C Q A H I V O Y H P L O B V A L O R E H H I N T D humanPARP3
400 R I H P I - - - S G G R V G K Q I Y F A S E H S K S A G Y V T H H C Q H O V Q Y H F L O E V A L O K E H H I T I D murinePARP

N P S L K S I B P P G K D S V I C L G R T E P O P A Q O D I E L E L D Q Q V V P L O P V X C A X F X S S X P S L - Y S Majority

970 980 990 1000 1010 1020

916 S H I S K - L P K G K H S V K G L G K T T P D P S A N I S L D - - - O V D V P L O T Q I S S O V - - - H D T S L L Y N humanPARP1
489 N P K A E G L L O C K H I S T K Q L G K M A P S S A H P V T L N - - - Q S T V P L O Q P A S D T G I L N P D G Y T L N Y N humanPARP2
463 N P S L K S P P P Q P D S V I A R C H I T E P D P T Q D T E L E L D C Q Q V V P C P E F S S S T P S Q - - - S humanPARP3
456 D P S L K S P P P Q G F D S V I A R G Q T E P D P A Q D I E L E L D Q Q P V V Q C P S F K S S S P S Q - - - S murinePARP

E Y L V Y X E S O V R L R Y L L E V U P N P - X X L W - Majority

1030 1040

988 E Y I V Y D I A Q V N L K Y V L K L K P N F K T S L W humanPARP1
545 E Y I V Y N P N O Y R M R Y D L V Q P N P - L Q L W humanPARP2
521 E Y L I Y O E S Q C R L R Y L L E V H L humanPARP3
514 E Y L I Y K E S Q C R L R Y L L E I H - - - - L murinePARP

529 Rec'd PCT/PTC 30 NOV 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/7

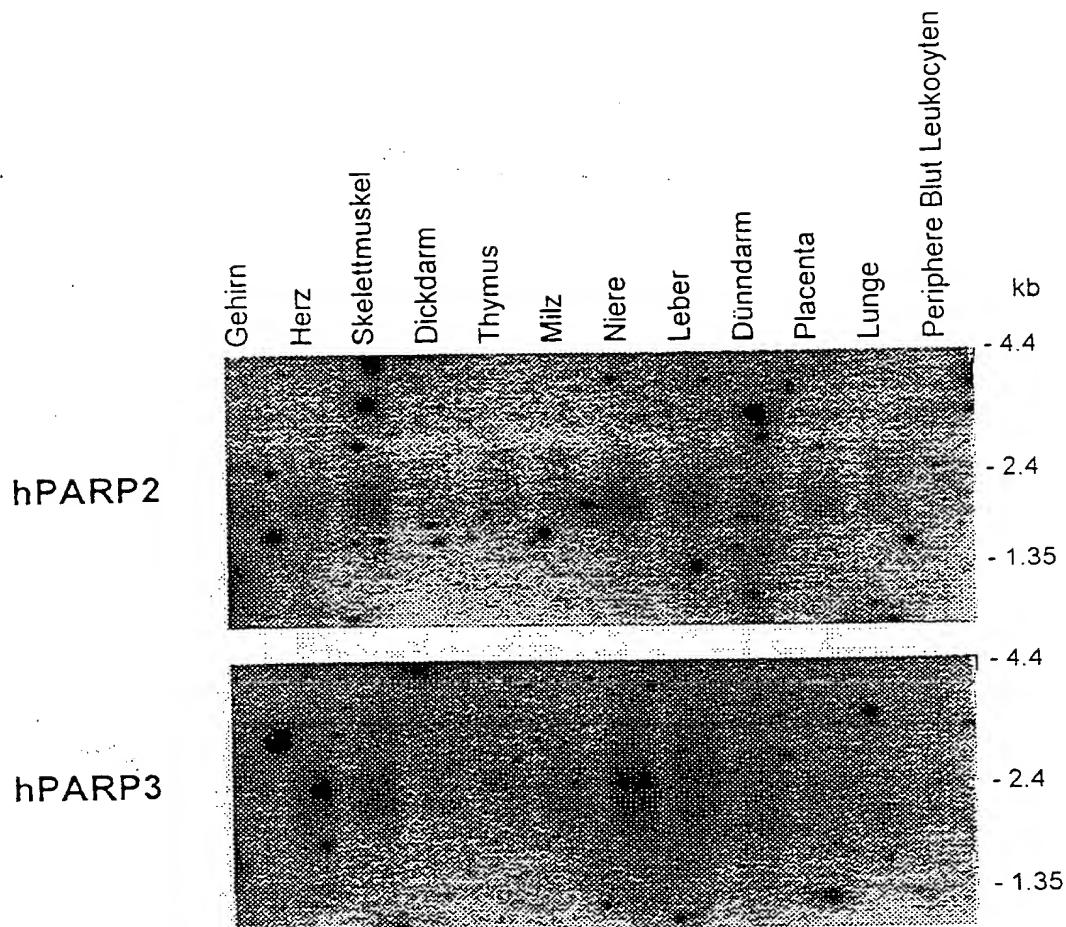


Fig. 2

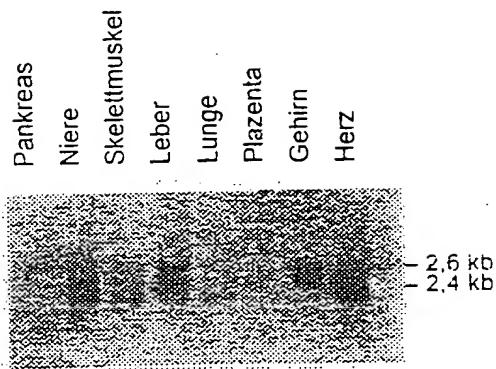
Northern Blot Analyse
Human PARP3 Gewebeverteilung

Fig. 3

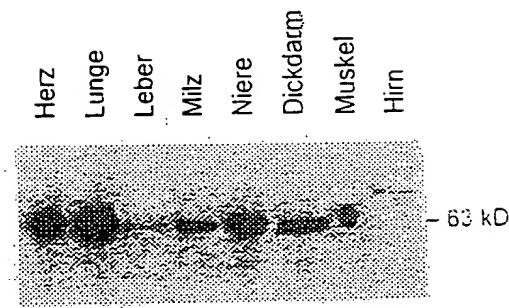
Western Blot Analyse
PARP3 Gewebeverteilung

Fig. 4

529 Rec'd PCT/PTO 30 NOV 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/7

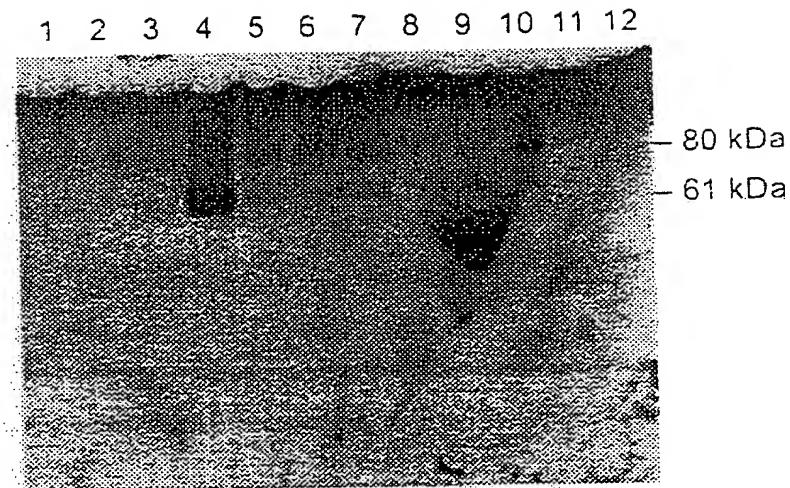
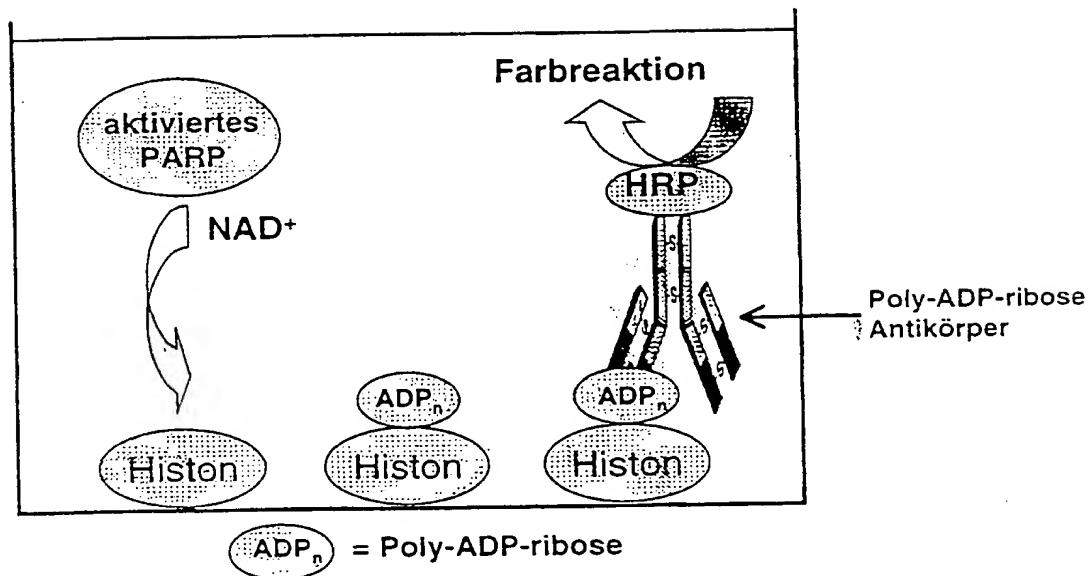


Fig. 5



HRP = Meerrettich-Peroxidase

Fig. 6

529 Rec'd PCT/PTC 30 NOV 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

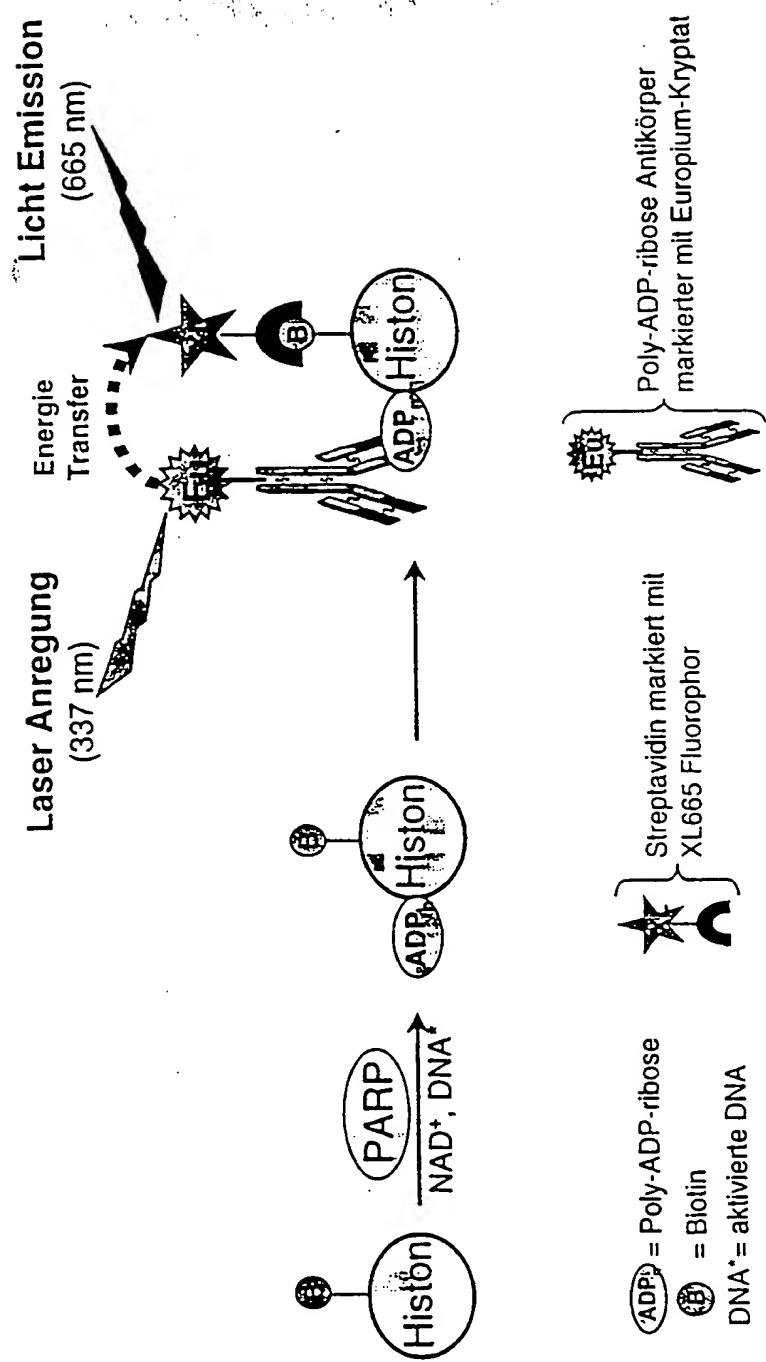


Fig. 7

529 Rec'd PCT/PTO 09 NOV 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No
PCT/EP 99/03889

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6	C12N9/10	C12N15/54	C07K14/455	C12N15/10	C12Q1/68
	G01N33/53	A61K48/00	A01K67/027	A61K31/70	A61K38/45

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 23 February 1998 (1998-02-23), XP002129091 HINXTON, GB</p> <p>AC= AA828649. Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1374175</p> <p>similar to gb:J03473 NAD(+) ADP-RIBOSYLTRANSFERASE (HUMAN); EST. abstract</p> <p>---</p> <p>DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 15 December 1996 (1996-12-15), XP002129092 HINXTON, GB</p> <p>AC = AA150787. Homo sapiens cDNA clone 489784 5' similar to SW:PPOL_XENLA P31669 NAD(+) ADP-RIBOSYLTRANSFERASE ;EST abstract</p> <p>---</p> <p>---</p>	1-3,6,7, 24
X		1-3,6,7, 24

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 January 2000

Date of mailing of the international search report

14/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte [REDACTED] Application No
PCT/EP 99/03889

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 707 011 A (PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS) 30 December 1994 (1994-12-30) the whole document ---	1-3, 5, 13, 18, 23, 25-27, 31
X	GRIFFIN R J ET AL: "NOVEL POTENT INHIBITORS OF THE DNA REPAIR ENZYME POLY(ADP-RIBOSE)POLYMERASE (PARP)" ANTI-CANCER DRUG DESIGN, GB, BASINGSTOKE, vol. 10, no. 6, 1995, page 507-514 XP002065156 ISSN: 0266-9536 cited in the application the whole document ---	13
A	WO 96 18737 A (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNG) 20 June 1996 (1996-06-20) the whole document ---	1-10, 23, 29, 31
A	LEPINIEC L ET AL., : "Characterization of an <i>Arabidopsis thaliana</i> cDNA homologue to animal poly(ADP-ribose) polymerase" FEBS LETTERS, vol. 364, 1995, pages 103-108, XP000867423 cited in the application figure 1 the whole document ---	4
A	BENEKE S. ET AL., : "Isolation of cDNA encoding full-length rat (<i>Rattus</i> <i>norvegicus</i>) poly (ADP-ribose) polymerase" BIOCHEM. MOL. BIOL. INT., vol. 43, 1997, page 755-761 XP000870495 abstract; figures 1,2 ---	4
A	US 5 272 057 A (SMULSON MARK E ET AL) 21 December 1993 (1993-12-21) abstract column 6, line 41 -column 7, line 21 ---	1, 24, 31
A	WANG Z-Q ET AL., : "PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis" GENES AND DEVELOPMENT, vol. 11, 1997, pages 2347-2358, XP002129093 page 2347 -page 2348 Discussion ---	11-13

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/03889

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KUEPPER J-H AND BUERKLE A.: "EXPRESSION OF THE DNA-BINDING DOMAIN OF HUMAN POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE AS A TRANS-DOMINANT INHIBITOR OF POLY(ADP-RIBOSYL)ATION IN TRANSFECTED EUKARYOTIC CELL LINES" 1992, POIRIER, G.G. AND MOREAU P., EDS, SPRINGER, NEW YORK XP000568905 page 38-46 page 45 ----	13, 29
P, X	JOHANSSON M.: "A human Poly(ADP-ribose) polymerase gene family (ADPRTL): cDNA cloning of two novel Poly(ADP-ribose) polymerase homologues" GENOMICS, vol. 57(3), 1999, page 442-445 XP000870418 the whole document ----	4, 7
P, X	BERGHAMMER H.A. ET AL., : "pADPRT-2: a novel mammalian polymerizing(ADP-ribosyl)transerase gene related to truncated pADPRT homologues in plant and <i>Caenorhabditis elegans</i> " FEBS LETT., vol. 449, 23 April 1999 (1999-04-23), page 259-263 XP000867424 the whole document ----	4, 7
T	AME J-C. ET AL., : "Identification and characterization of a new isoform of poly(ADP-ribose) polymerase: PARP-2" J. BIOL. CHEM., vol. 274, 18 June 1999 (1999-06-18), page 17860-17868 XP002129094 figure 5 the whole document -----	1-10, 13, 24, 25, 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP99/03889

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although claim no.27 relates to a method of diagnosis that is carried out on the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compounds/compositions.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/03889

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
FR 2707011	A 30-12-1994	NONE			
WO 9618737	A 20-06-1996	DE 4444949 C		21-11-1996	
		EP 0871742 A		21-10-1998	
		JP 10510160 T		06-10-1998	
US 5272057	A 21-12-1993	US 5449605 A		12-09-1995	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03889

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N9/10 C12N15/54 C07K14/455 C12N15/10 C12Q1/68
G01N33/53 A61K48/00 A01K67/027 A61K31/70 A61K38/45

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ¹	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 23. Februar 1998 (1998-02-23), XP002129091 HINXTON, GB AC= AA828649. Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1374175 similar to gb:J03473 NAD(+) ADP-RIBOSYLTRANSFERASE (HUMAN); EST. Zusammenfassung ---	1-3, 6, 7, 24
X	DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 15. Dezember 1996 (1996-12-15), XP002129092 HINXTON, GB AC = AA150787. Homo sapiens cDNA clone 489784 5' similar to SW:PPOL_XENLA P31669 NAD(+) ADP-RIBOSYLTRANSFERASE ;EST Zusammenfassung ---	1-3, 6, 7, 24
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28. Januar 2000

14/02/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONALER FORSCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/03889

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR 2 707 011 A (PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS) 30. Dezember 1994 (1994-12-30) das ganze Dokument ---	1-3, 5, 13, 18, 23, 25-27, 31
X	GRIFFIN R J ET AL: "NOVEL POTENT INHIBITORS OF THE DNA REPAIR ENZYME POLY(ADP-RIBOSE)POLYMERASE (PARP)" ANTI-CANCER DRUG DESIGN, GB, BASINGSTOKE, Bd. 10, Nr. 6, 1995, Seite 507-514 XP002065156 ISSN: 0266-9536 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	13
A	WO 96 18737 A (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNG) 20. Juni 1996 (1996-06-20) das ganze Dokument ---	1-10, 23, 29, 31
A	LEPINIEC L ET AL., : "Characterization of an <i>Arabidopsis thaliana</i> cDNA homologue to animal poly(ADP-ribose) polymerase" FEBS LETTERS, Bd. 364, 1995, Seiten 103-108, XP000867423 in der Anmeldung erwähnt Abbildung 1 das ganze Dokument ---	4
A	BENEKE S. ET AL., : "Isolation of cDNA encoding full-length rat (<i>Rattus</i> <i>norvegicus</i>) poly (ADP-ribose) polymerase" BIOCHEM. MOL. BIOL. INT., Bd. 43, 1997, Seite 755-761 XP000870495 Zusammenfassung; Abbildungen 1,2 ---	4
A	US 5 272 057 A (SMULSON MARK E ET AL) 21. Dezember 1993 (1993-12-21) Zusammenfassung Spalte 6, Zeile 41 -Spalte 7, Zeile 21 ---	1, 24, 31
A	WANG Z-Q ET AL., : "PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis" GENES AND DEVELOPMENT, Bd. 11, 1997, Seiten 2347-2358, XP002129093 Seite 2347 -Seite 2348 Discussion ---	11-13
		-/-

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03889

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	KUEPPER J-H AND BUERKLE A.: "EXPRESSION OF THE DNA-BINDING DOMAIN OF HUMAN POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE AS A TRANS-DOMINANT INHIBITOR OF POLY(ADP-RIBOSYL)ATION IN TRANSFECTED EUCLYOTIC CELL LINES" 1992, POIRIER, G.G. AND MOREAU P., EDS, SPRINGER, NEW YORK XP000568905 Seite 38-46 Seite 45 ---	13, 29
P, X	JOHANSSON M.: "A human Poly(ADP-ribose) polymerase gene family (ADPRTL): cDNA cloning of two novel Poly(ADP-ribose) polymerase homologues" GENOMICS, Bd. 57(3), 1999, Seite 442-445 XP000870418 das ganze Dokument ---	4, 7
P, X	BERGHAMMER H.A. ET AL., : "pADPRT-2: a novel mammalian polymerizing(ADP-ribosyl)transerase gene related to truncated pADPRT homologues in plant and Caenorhabditis elegans" FEBS LETT., Bd. 449, 23. April 1999 (1999-04-23), Seite 259-263 XP000867424 das ganze Dokument ---	4, 7
T	AME J-C. ET AL., : "Identification and characterization of a new isoform of poly(ADP-ribose) polymerase: PARP-2" J. BIOL. CHEM., Bd. 274, 18. Juni 1999 (1999-06-18), Seite 17860-17868 XP002129094 Abbildung 5 das ganze Dokument -----	1-10, 13, 24, 25, 28

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03889

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. 27
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der Anspruch 27 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindungen/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03889

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
FR 2707011	A 30-12-1994	KEINE		
WO 9618737	A 20-06-1996	DE	4444949 C	21-11-1996
		EP	0871742 A	21-10-1998
		JP	10510160 T	06-10-1998
US 5272057	A 21-12-1993	US	5449605 A	12-09-1995

THIS PAGE BLANK (USPTO)